

**Über eine Methode zur Bestimmung
von Methylpentosen und ihre
Anwendung zur Erfassung der
Fucose im Serum
und in Proteinfractionen**

Peter Brünger

1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554012_0059

**Über eine Methode zur Bestimmung
von Methylpentosen und ihre
Anwendung zur Erfassung der
Fucose im Serum
und in Proteinfractionen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Brüngrer
aus Lage (in Lippe)

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. H. SCHWIEGK
Dekan: Professor Dr. Dr. H. EYER

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1960



MEINEN ELTERN

GEWIDMET

GLIEDERUNG

A. Allgemeines über Mucopolysaccharide im menschlichen Serum.

B. I. Befunde über:

- | | | |
|----------------------------|---|---|
| a) L-Fucose | } | (Entdecker, Konfiguration, chem. Eigenschaften, Nachweis, Vorkommen usw.) |
| b) D-Fucose | | |
| c) einige verwandte Zucker | | |

II. Vorkommen der L-Fucose in Mucoproteinverbindungen der Natur.

III. Methoden der Fucosebestimmung:

- a) verschiedene in der Literatur mitgeteilte Methoden.
- b) spektrophotometrische Methode nach Dische:
 - 1. allgemeine Erklärung
 - α) chemisch
 - β) physikalisch
 - γ) Grundlagen der Cystein-Reaktion
 - 2. Beschreibung der verwandten Methode
 - 3. eigene Versuche zu dieser Methode

IV. Fucose-Bestimmungen:

- 1. in menschlichen Normalseren
- 2. in menschlichen pathologischen Seren
- 3. in menschlichen Serumfraktionen

C. Zusammenfassung der Ergebnisse

D. Tabellen und Kurven

E. Literaturverzeichnis

MUCOPOLYSACCHARIDE IM MENSCHLICHEN SERUM

Seit es durch moderne Methoden wie spezifische Fällungsreaktionen, elektrophoretische und Ultrazentrifugen-Trennungen möglich wurde, Proteine zu isolieren, stellte sich in der klinischen Chemie ein wachsendes Interesse an der eingehenden chemischen Analyse der Eiweisskörper des menschlichen Plasma ein.

Dabei zeigte sich, dass ein Teil dieser Eiweisskörper sehr starke Anteile von proteingebundenen Kohlehydraten aufweist, ein anderer Teil diese in geringerem Masse enthält, während z.B. die Albumine völlig frei von Kohlehydraten sind, wenn sie rein dargestellt wurden (SCHULTZE, 72).

Da bis heute noch eine nur unvollständige Kenntnis über die Struktur dieser speziellen Gruppe der konjugierten Proteide vorliegt, führte das infolge unterschiedlicher Isolierungsmethoden und Aufarbeitungswegen zu einer Fülle von Benennungen und vielen Synonyma, die jeweils nur eine bestimmte Eigenschaft berücksichtigen.

Es sind von verschiedenen Seiten Versuche einer Gliederung dieses Gebietes unternommen worden, so von STACEY und BLIX. Eine von den meisten anerkannte Einteilung stammt von MEYER (53). Sie soll - wie auch eine von SÜDHOF (80), die im wesentlichen auf sie zurückgeht - hier wiedergegeben werden (s. Anhang AI), um die Beziehungen zu den anderen biologischen Eiweisskörpern mit Kohlehydratkomponenten aufzuzeigen. - Danach gehören die Proteide des Serums zu den Mucoiden (Oligoglykoproteide = bis 4 % Kohlehydratanteile im Eiweiss) und zu den Glykoproteiden (Polyglykoproteide = über 4 % Kohlehydratanteile).

Mit unterschiedlichen Methoden wurden verschiedene kohlenhydratreiche Fraktionen des Serums isoliert. Die erste dieser Art war das "Seromucoid" von ZANETTI (104), das als Tetrabenzozat gewonnen wurde. Es wurde auch von anderen Forschern später dargestellt und analysiert (HEWITT (37), REMINGTON (67) u. a.). Andere verwandte Fraktionen sind das von WINZLER (102), MEHL (102) u. a. aufgefundene "Mucoproteid", ferner das "Seroglykoid" und "Globoglykoid" von HEWITT (37) u. a.

Von SCHULTZE (72) wurden besonders die Glykoproteide der Globulinfraktion isoliert und ihre Trennung von Albumin, das keine Kohlehydratkomponente enthält, durchgeführt.

Die Identifizierung der Kohlehydratbestandteile erfolgte zumeist durch hydrolytische Abspaltung der einzelnen Komponenten und folgendem papierchromatographischen Nachweis durch colorimetrische und spektrophotometrische Verfahren.

Dabei stellte sich schon bald heraus, dass diese Kohlehydratgruppen u. a. aus Hexosamin und Hexosen bestanden.

Nach RIMINGTON (67) setzten sich diese aus äquimolekularen Teilen von Galactose und Mannose zusammen, wobei durch neuere Untersuchungen festgestellt wurde, dass die beiden Zucker auch in anderen Relationen auftreten.

WEIMER, MEHL und WINZLER (97) untersuchten den Hexosaminanteil und bestimmten ihn als Glucosamin.

Während die genannten Zucker schon längere Zeit als wesentlicher Bestandteil der kohlehydrathaltigen Eiweisskörper bekannt waren, wurde in letzter Zeit auch die L-Fucose in ihnen aufgefunden. DISCHE und OSNOS (15/16) zeigten zum ersten Mal, dass Fucose auch im Serum vorkommt (siehe Literaturübersicht).

Während nun die Bestimmung der anderen genannten Kohlehydratanteile schon von zahlreichen Arbeitsgruppen durchgeführt wird, und darüber doch schon ausführliche Befunde vorliegen, ist die Zahl der Bestimmungen von Fucose in Serum-eiweisskörpern erst gering. Es erschien daher zweckmässig, für eigene Studien des Eiweisslabors an der I. Medizinischen Univ.-Klinik in München die Voraussetzungen und die Methodik der Bestimmungen zu studieren und zu versuchen, sie den Erfordernissen anzupassen, sodass Untersuchungen des Fucosegehaltes von Eiweisskörpern im Rahmen vorgesehener Arbeiten möglich wurden.

CHEMISCHE BEFUNDE

Die Fucose kommt in der Natur in zwei spiegelisomeren Formen vor, der D- und der L-Fucose.

Ihrer Struktur nach ist sie eine am 5. Kohlenstoffatom methylierte Pentose, die ihre Konfiguration von der Galaktose herleitet (siehe Formeln I. -VI.; Anhang A II). Diese Beziehung kommt auch in den für diesen Zucker begräuchlichen Synonymen Methylpentose, 6-Desoxy-(L,D-)Galaktose, Galaktomethylse zum Ausdruck.

Die L-FUCOSE wurde 1890 von TOLLENS und Mitarbeitern (5, 28, 29) im Seetang (*FUCUS vesiculosus*, *nodosus* usw.) entdeckt. Von ihnen wurde auch schon die Konstitution aufgedeckt (61, 86). Sie ist durch oben erwähnten Vergleich mit der L-Galaktose vor Augen geführt (Formeln IV. -VI.; Anhang A II).

Chemische Eigenschaften (87): Der Zucker kristallisiert in feinen, mikroskopischen Nadeln. Der Schmelzpunkt liegt bei $S = 145^{\circ}$. In wässriger Lösung erfolgt Mutarotation $(a)_{\text{D}}^{20} = 124,1^{\circ}$ (Anfangswert) $\rightarrow 76,4^{\circ}$ (Endwert). Die kristalline Form liegt also als L-Fucose vor. Sie ist in Wasser und Alkohol gut löslich; reduzierte Fehling'sche Lösung. Mit Hefe ist sie nicht vergärbar. Die molekulare Verbrennungswärme beträgt 712 Cal.

Durch Reduktion mit Na-Amalgam entsteht L-Fucit (Formel VIII. $S = 153-154^{\circ}$. $(a)_{\text{D}}^{20} = +4,7$ (in 10 % Borax)). Fucit wird von Sorbosebakterien nicht angegriffen. Wenn man mit Bromwasser oxydiert, bildet sich L-Fuconsäure (Formel X.). Bei starker Oxydation mit Salpetersäure erhält man aus L-Fucose $\rightarrow$ D-Arabo-trioxyglutarsäure (Formel XI.).

Der analytische Nachweis kann durch Überführung in das p-Brom-phenylhydrazon erfolgen ($S = 181-184^{\circ}$); ebenso durch das Di-phenylhydrazon ($S = 198^{\circ}$), oder durch das p-Toluolsulfonylhydrazon ($S = 174^{\circ}$).

Die Darstellung wird am besten nach einem von Bieler und Tollens angegebenen Verfahren (5) vorgenommen: Seetang (*Fucus vesiculosus*, *nodosus* usw.) wird 3 Stunden lang bei 100° mit 3 %iger Schwefelsäure hydrolysiert; sodann neutralisiert, filtriert und eingedampft. Gummistoffe werden mit Alkohol gefällt. Darauf überführt man die Fucose mittels Phenylhydrazin in das schwer lösliche Hydrazon und fällt sie so aus. Der Zucker wird mit Benzaldehyd abgeschieden und kristallisiert allmählich aus.

Vorkommen: L-Fucose wird am häufigsten im Pflanzenreich als Zellwandbestandteil einiger Dikotylen und mariner Algen gefunden. Sie liegt dort als polymeres Anhydrit Fucosan vor. (Fucosane sind wie Rhamnosane s. u. Hemi-

zellulosen = polymere Kohlehydrate, die bei ihrer Hydrolyse nur einfache Zucker liefern). Sie ist bei den Leguminosen in den Astragulusarten z. B. im Traganth vorhanden, ferner in der Faserwand des Flachses. Unter den erwähnten Tangen findet man sie im *Fucus vesiculosus* (gemeinem Blasentang), *F. virsoides*, *F. serratus* (Sägetang), *F. nodosus* (*Ascophyllum nodos.* Knotentang). Ebenso in Rotalgen (*Rhodophyceae*) z. B. in *Porphyra laciniata* (45, 66).

Als Baustein von Tierorganismen wurde die L-Fucose erst in letzter Zeit nachgewiesen, und zwar 1946 in blutgruppenspezifischen Substanzen (9), später auch in Froschlaichmucinen (23) und in der Hüllensubstanz von *Echinocordium chordatum* (89). Man findet sie auch in den Glycoproteiden der Descemet'schen Membran des Auges (21). Weiterhin als Zuckerbaustein der Polysaccharidkomponente einiger Lipopolysaccharide von Bakterien wurde sie beschrieben, z. B. *Escherichia coli* 086 und verschiedener *Salmonella*-arten (12, 98).

Ferner fand sie sich in einigen hauptsächlich entodermalen Schleimsubstanzen - nach Blix *Fucomucine* genannt (6, 7) - u. a. auch des menschlichen Organismus (78). Bemerkenswert ist dabei vor allem, dass sie stets mit wenigen und denselben anderen Zuckern gemeinsam festgestellt wurde, und diese Komplexe Blutgruppenwirksamkeit zeigten. Im Urin (33, 34, 8), im Bindegewebe (41) und verschiedenen mesenchymalen und parenchymatösen Geweben (14) und in der Frauenmilch (38, 48, 49) wurde sie ebenfalls nachgewiesen. Ausführlicher wird darüber in der Literaturbesprechung referiert werden, vor allem auch über das Vorkommen als Glykoproteidkomponente der Serumproteine, mit denen sich auch diese Arbeit speziell beschäftigt.

Die D-FUCOSE wurde von ihrem Entdecker (1900) VOTOČEK (90) zuerst Rhodeose genannt. Später entdeckte man, dass es sich um das spiegelisomere Analogon der vorher von Tollens entdeckten (L-)Fucose handelte (91). Aus dieser Beziehung ergibt sich auch ihre Konfiguration (Formel I. und II.; Anhang A II). Sie wurde auf kompliziertem Wege durch Votoček aufgeklärt (92); später durch synthetische Darstellung aus der D-Galaktose von Freudenberg und Raschig.

Chemische Eigenschaften: Sie bildet süsse nadelförmige Kristalle und schmilzt bei $S = 140-145^\circ$. Die Mutarotation in wässriger Lösung beträgt $(a)_D^{19} = +127,0^\circ$ (Anfangswert) $\rightarrow 76,3^\circ$. (Extrapolierter Anfangswert für α -D-Fucose = $+143,9^\circ$). In Alkohol ist der Zucker wenig löslich; mit Hefe wie die L-Form nicht vergärbbar.

Ferner gibt sie analog zur L-Fucose die charakteristischen chemischen Reaktionen: Reduktion mit Na-Amalgam führt zu D-Fucit oder Rhodeit (Formel VII.; Anhang A II) $S = 153,5^\circ$ $(a)_D^{19} = -1,45^\circ$. Oxydation mit Bromwasser lässt D-Fuconsäure entstehen (Formel IX). Starke Oxydation mit HNO_3 bildet aus der D-Fucose $\rightarrow$ L-Arabo-trioxy-glutarsäure (Formel XII.).

Zum analytischen Nachweis können folgende charakteristischen Hydrazone dienen: P-Bromphenylhydrazon $S = 184^{\circ}$; p-Toluolsulfonylhydrazon $S = 175^{\circ}$; Diphenylhydrazon $S = 199^{\circ}$; Methylphenylhydrazon $S = 181^{\circ}$; Benzylphenylhydrazon $S = 178-179^{\circ}$.

Zur Darstellung kann man die Glykoside Convolvulin und Jalapin aus der Jalapawurzel benutzen. Man hydrolysiert diese mit schwachen Säuren.

Vorkommen: D-Fucose konnte als glycosidisches Spaltprodukt bei einigen Convolvulaceae-Arten gefunden werden: *Ipomoea purga*, die früher als Purgativum benutzt wurde; *Ipomoea Jalapa*; ferner aus dem Glycosid Convolvulin (45). Neben anderen Zuckern wie Rhamnose, Digitalose u.a. Methylpentosen (s.u.) kommt sie auch in einigen herzwirksamen Glycosiden vor (65).

Im tierischen Organismus wurde D-Fucose bisher anscheinend nicht nachgewiesen.

Ein Racemat von D, L-Fucose erhielt Votoček (93) dadurch, dass er gleiche Teile der beiden Formen zusammenmischte. Der Schmelzpunkt S liegt bei 161° . Das Racemat ist 5-mal weniger löslich als seine beiden Bestandteile.

Zu erwähnen wären noch einige der Fucose verwandte Zucker: Die L-Rhamnose (6-Desoxy-L-Mannose, Formel XIII.; Anhang A II) deshalb, weil sie sich in der hier angewandten Nachweisreaktion völlig gleichartig verhält (18). Ihre Konkurrenz braucht aber bei Bestimmungen in Serumproteiden nicht gefürchtet zu werden, weil sie dort nicht vorkommt. Man findet sie im Pflanzenreich z.B. in herzwirksamen Glycosiden oder als Rhamnosane wie die Fucosane in Zellwandsubstanzen. Eine 3-Methyl-D-Fucose ist die Digitalose, ein Zuckerbestandteil in herzwirksamen Glycosiden; ebenso die Diginose (2-Desoxy-3-Methyl-D-Fucose), die im Diginin vorkommt, das die Digitalisglycoside begleitet (36); (Formeln XIV. und XV.; Anhang A II). Als Epifucose wird eine Methylpentose bezeichnet, die sich von der Fucose am 2. Kohlenstoffatom unterscheidet, auch Talomethylose genannt. Sie hat aber sonst keine Beziehungen zur Fucose.

LITERATUR ÜBER DAS VORKOMMEN VON FUCOSE

Anfänglich wurden beide Formen der Fucose lediglich in pflanzlichem Untersuchungsmaterial nachgewiesen. TÖLLENS und Mitarbeiter (5, 28, 29, 61, 99) entdeckten die L-Fucose im Seetang, VOTOČEK (90) die D-Fucose in Convolvulacea-Arten. Die L-Fucose, welche in dieser Arbeit allein interessiert, wurde ausserdem von McNAUGHT, SMITH und BLOCK (57), ROSS (68) und SANNIE (69) in verschiedenen Algenarten (66), (siehe auch die Zusammenstellung über das Vorkommen), nachgewiesen. In der Flachsfaserwand wurde sie von CASH-MORE (11) gefunden.

In tierischen Glycoproteiden kommt die L-Fucose meist als Bestandteil der von BLIX (6, 7) als FUCOMUCINE bezeichneten Gruppe vor. (Den Kohlehydratanteil nennt er Fucomucan). FOLKS, GRANT und JONES (23) stellten Fucose - im Folgenden ist immer von der L-Fucose die Rede - im Froschlaichmucin fest und konnten nachweisen, dass die Hülle des Froscheies zum grössten Teil aus Fucomucin besteht. Die gallertartige Hüllsubstanz von Echinocordium chordatum soll nach VASSEUR (89) 34,4 % Fucose enthalten. Die sehr grosse Menge des Zuckers soll hier mit einem Protein gekoppelt vorkommen. Man denkt sich, dass das Fucomucin in diesem Falle als kammartig angeordnetes Gerüst vorliegt.

Die Ersten, die Fucose im tierischen Organismus bestimmten, waren BRAY, HENRY und STACEY (9, 82). Sie fanden sie als Bestandteil der Blutgruppensubstanz A. Diese Ergebnisse bestätigten bald darauf ebenso AMINOFF und MORGAN (1) und BENDICH, KABAT und BEZER (3). Seit bekannt ist, dass die blutgruppenspezifischen Substanzen nicht nur an menschlichen oder tierischen Erythrozyten auftreten, sondern auch in wasserlöslicher Form in vielen Sekreten und Körperflüssigkeiten zu finden sind, wurde von den verschiedenen Autoren Fucose auch hier als Bestandteil der wirksamen Substanz aufgefunden.

MORGAN und Mitarbeiter (60, 1) isolierten die wasserlöslichen Blutgruppenpolysaccharide A, B, H (O) und Le^a aus pseudomucinösen Ovarialcysten und wiesen neben Hexosaminen, einzelnen Hexosen auch Fucose in beträchtlichen Mengen nach. Sie vermuteten, auf ihre Untersuchungen gestützt, dass sich die Blutgruppensubstanzen aus "repeating units" zusammensetzten, Monosaccharidkomplexen von bestimmtem, immer konstantem Aufbau (zum Beispiel für die A-Substanz im Verhältnis N-Acetylhexosamin : Galaktose : Fucose wie 2 : 1 : 1) (77). Nach Untersuchungen von AMINOFF, MORGAN u. a. (1), KABAT (42), sowie KABAT, BAER, BEZER und KNAUB (43) soll die Fucose am freien Ende dieser Grundeinheiten sitzen. MORGAN (60) erhielt auch Fucoseeinheiten (in Form von Oligosacchariden) durch milde Hydrolyse von blutgruppenspezifischen Substanzen. Ausserdem prüfte er einige Fucose - Oligosaccharide auf ihre serologische Akti-

vität (Hämagglutinationstest) und fand einzelne, z.B. eine Lacto-N-fucopentaose höchst aktiv in der Hemmung von $\text{Le}^{\text{a}+}$ -Erythrozyten gegen Anti- Le^{a} -Serum. Daraus schloss er, dass Fucose ein sehr wichtiger Bestandteil des Le-Faktors sein müsste. Schliesslich stellte er fest, dass sich die Blutgruppensubstanzen sehr in ihrer chemischen Zusammensetzung gleichen. Ähnliche Ergebnisse erzielten WATKINS und MORGAN (96) auch dadurch, dass sie die Spezifität einzelner Zucker für bestimmte Blutgruppen insofern nachweisen konnten, als diese die Substanzen vor enzymatischem Abbau schützten, und zwar Fucose und D-Galactosamin die O(H)-Substanz. Mit dieser Methode der Hemmung des enzymatischen Abbaus von Blutgruppensubstanzen durch Fucose und ihre Verbindungen erwiesen auch KABAT (44) und SPRINGER (77, 75) den Zucker als spezifischen Baustein der Substanzen. Andererseits zeigten GYÖRGY und Mitarbeiter (30) und SPRINGER und GYÖRGY (79), dass durch enzymatischen Abbau Fucose aus Blutgruppensubstanzen abgespalten wird. SPRINGER (76) fand auch in einigen Pflanzen (*Taxus* u. ä.), sowie in verschiedenen Bakterien und im Mekonium Substanzen, welche Blutgruppenagglutination hemmten, sodass ihr Aufbau ebenfalls Fucose als Bestandteil erwarten liess, was durch chemische Analysen zumeist auch bestätigt werden konnte.

Nachdem BURNET, McCREA und ANDERSON (10) gezeigt hatten, dass virus-hämagglutinationshemmende Substanzen gemeinsam mit Blutgruppensubstanzen vorkommen, lag die Vermutung nahe, dass sie ähnlich gebaut seien. Es wurde dann auch von verschiedenen Forschern Fucose, Hexosamin und eine Hexose als Baustein nachgewiesen: McCREA (55), GOTTSCHALK (26, 27), ODIN (63), MANDEL und RACKER (54), McCREA (56) und GOTTSCHALK (27).

Auch die Virusreceptorsubstanzen menschlicher Erythrozyten besitzen nach McCREA (56) und ODIN (63) die Zucker: Fucose, Hexosamin und eine Hexose. Nach SPRINGER (78) werden Virushämagglutinationshemmer in zahlreichen epithelialen Sekreten gefunden, so im Cervikalschleim, Magensekret, Sputum, Nasenschleim, Tränen, Mekonium, ferner im Urin durch Sekretion von subepithelialen und submucösen Drüsen der Harnrohre und Vulva; (Littre, Cowper und Bartholini).

In Frauenmilch wurde von KUHN, GAUHE und BAER (48) und HEYNS, WALTER und HEYDE (38) Fucose nachgewiesen. KUHN (49) untersuchte vier verschiedene Fucoside aus Frauenmilch auf ihre Wirksamkeit, die Agglutination menschlicher O(H)-Blutkörperchen durch Aalblut zu verhindern. Es liessen sich aber daraus keine Rückschlüsse auf eine Ähnlichkeit im Bau mit den blutgruppenspezifischen Substanzen schliessen.

Von GYÖRGY und Mitarbeitern (31) wurde eine Variante des *Lactobazillus bifidus* (var. penn.) entdeckt, die Frauenmilch zum Wachstum benötigte. Ein Enzympräparat von *Lactobazillus bifidus* var. penn. setzte nach Arbeiten von

GYÖRGY und SPRINGER (30) aus Mekonium N-Acetylhexosamin, Fucose und Galactose frei. Ebendiese wiesen auch nach, dass von Blutgruppensubstanzen eine Bifiduswachstumswirkung ausgeht und dass auf der anderen Seite durch ein Bifidusenzymgemisch Blutgruppensubstanzen inaktiviert werden, wobei dann gleichzeitig Fucose, Galactose und N-Acetylhexosamin als Abbauprodukte auftreten und nachgewiesen werden können (32, 77, 85). Fucose dagegen besitzt die Eigenschaft, die Inaktivierung des Blutgruppenmucoids durch "Bifidus-Enzym" zu hemmen. GYÖRGY (30, 32) wies dann auch in aus Milch isolierten Präparaten mit Bifiduswirksamkeit papierchromatographisch N-Acetylglucosamin, Glucose, Galactose und Fucose nach.

LATNER, MERRILS und RAINE (50, 57) und ebenso auch GLASS (24) fanden im Castle'schen Intrinsic-Factor ebenfalls Fucose, neben Hexosamin und Galactose-Mannose, und zwar im Verhältnis Fucose 2 %, Hexosamin 6,5 - 9 %. SPRINGER (25) wies in ihm hohe Blutgruppen- und Bifidusaktivität nach, worauf der chemische Aufbau ja auch hinweist.

SHETTLES und DISCHE (73) isolierten aus menschlichem Cervicalschleim ein neutrales Mucopolysaccharid, das eine Methylpentose, Galactose und Hexosamin enthielt. Seine Zusammensetzung ähnelt also auch sehr den menschlichen Blutgruppensubstanzen.

Aus Urin isolierten HAMERMANN, HATCH, REIFE und BARTZ (34, 33) einen nicht mehr dialysierbaren Rückstand von Mucoproteidcharakter, der teils hydrolysiert und papierchromatographisch bestimmt wurde, teils unhydrolysiert durch spektrophotometrische Methoden (nach Dische) analysiert wurde. Sie fanden dabei neben Hexose, Hexosamin und Hexuronsäure auch Fucose.

Dasselbe stellten ANDERSON und MAGLAGAN (2) fest, die Galactose und Mannose, Hexosamin und auch Fucose nachwiesen. TAYEAU zusammen mit NIVET (84, 85) kam zu den gleichen Ergebnissen. Von BOYCE, GARVEY und NOR-FLEET jr. (8) wurde aus Urin ein Mucoproteid "Uromucoid" isoliert, in dem sie, wie vor ihnen schon GOTTSCHALK (27), ODIN (64) und TAMM und HORSFALL (83) Hexosen, Hexosamin, Sialin (= Neuramin-) Säure und Fucose vorfanden. Aus seinen Experimenten an Urinen verschiedener Zusammensetzung im Bezug auf Mineralien und Mucoidsubstanzen machte BOYCE (8) wahrscheinlich, dass dieses "Uromucoid" in seiner "aktivierten Form" über die Bildung von Calcium-Metallchelaten und Micel-Strukturierung für die Bildung von Steinen verantwortlich ist. Er nimmt an, dass es aus dem Epithel des harnableitenden Systems stammt.

Für die Herkunft der bisher besprochenen fucosehaltigen Mucoide hat SPRINGER (78) das entodermale Epithel, vornehmlich die Becherzellen und grössere

schleimproduzierende Drüsen, verantwortlich gemacht. Er bewies, dass an Spezialfärbungen nach Hotchkiss - McManus von verschiedenen mikroskopischen Präparaten (Colon, Cervix, cystischer Brenntumor, Submaxillaris, Duodenum) sich diese Strukturen elektiv anfärben. Auch BLIX (6, 7) sagt, dass Fucomucin vorherrschend in epithelialen Schleimen vorkommt. Und ODIN (64) wies nach, dass der überwiegende Teil dieser epithelialen Schleime Fucose enthält. Er gibt auch an, dass fast alle eine Blutgruppenaktivität besitzen.

In einigen gramnegativen Bakterien, vor allem Salmonella-Arten, konnte DAVIES (12) neben anderen Zuckern auch Rhamnose und Fucose feststellen. Gleiche Befunde stammen von WESTPHAL, LÜDERITZ, EICHENBERGER und NETER (98).

Aus Rindertonsillen isolierten HESS, AYALA und HERRANEN (35) ein Mucoprotein, in welchem neben Hexosen (11 %), Hexosamin (9,7 %), auch Methylpentosen (nach Dische) nachgewiesen wurden; ihr Anteil betrug 1,7 % - bezogen auf Trockensubstanz.

GLEGG, EIDINGER und LEBLOND (25) führten in Hydrolysaten von Bindegeweben (Sehnen, Knorpel, Knochenkompakta) den papierchromatischen Nachweis von Galactose, Mannose und Fucose. In reticulären Fasern fand sich Fucose in höherer Konzentration als in kollagenen. (In einer der durch unterschiedliche Alkoholkonzentration gefällten Substanzen fand sich auch Glucuronsäure.)

DOHLMANN und BALAZS (21) erhielten Fucose neben Galactose, Glucose, Mannose und Hexosamin aus Polysaccharidgruppen des Eiweisses der Descemet'schen Membran des Auges.

JORPES und YAMASHINA (41) stellten Fucose neben anderen Zuckern im Nucleus pulposus (Keratoschwefelsäure) fest, ebenso in der Enterokinase neben Glucosamin, Galactose und Mannose.

Nach Dische wiesen GLEGG und Mitarbeiter (25) Galactose, Mannose, Glucose und Fucose auch im Bindegewebe von Lunge und Lymphknoten nach, also hauptsächlich in reticulärem Fasergewebe. DISCHE und Mitarbeiter (14) analysierten Knochen und Glaskörper und zeigten dort die gleichen Zucker auf.

DISCHE und OSNOS (15) erbrachten auch den Beweis, dass Fucose neben Hexosamin, Galactose und Mannose in verschiedenen tierischen Geweben, darunter Gehirn, Nieren, Muskeln, Herz und Pankreas von Ratten, Mäuseniere, Sarkom und menschlichem Serum (s.u.), vorkommen. Sie vermuteten deshalb, dass in den meisten tierischen Geweben proteingebundene Polysaccharide wie in den Blutgruppen vorkämen.

Für diese Arbeit ist es natürlich besonders wichtig, dass sie sich auf Arbeiten in der Literatur bezieht, die sich mit dem Vorkommen von Fucose im Serum und in isolierten Serumproteinfraktionen beschäftigen. Da bisher noch nicht viele Untersuchungen in diesem Substrat vorgenommen wurden, gibt es nur wenig vergleichbare Anhaltspunkte. Sie stammen erst aus den letzten Jahren.

In der oben erwähnten Arbeit zeigten DISCHE und OSNOS (15) zum ersten Mal, dass Fucose auch im Serum vorkommt. Sie stellten das auch in zwei durch verschieden konzentrierte Alkoholfällung erhaltenen Fraktionen aus dem Serum fest, wie sie in einer anderen Arbeit (16) mitteilten. Im gleichen Jahr fand WALDRON (94) in Hydrolysaten von Serum diesen Zucker. DISCHE und Mitarbeiter (13) spalteten durch milde Hydrolyse (Trichloressigsäure) aus verschiedenen Serumfraktionen Fucose ab. Sie bestimmten das Verhältnis der abgespaltenen Menge der verschiedenen Fraktionen und konnten Schlüsse auf Strukturunterschiede ziehen (13).

WINZLER (103) wies in einer zusammenfassenden Arbeit über Serumglycoproteide nach, dass in pathologischer Seren für alle vorkommenden Zucker quantitative Differenzen auftreten und zeigt diese für Hexosen, Hexosamin, Fucose, Sialin-(Neuramin-)säure und die Serumfraktion "Seromucoid" auf. ISLIKER (40) bestimmte den Anteil von Fucose in Globulinen und fand einen Gehalt von 0,2 - 0,3 % Fucose. Auch SONNET (74) stellte quantitative Analysen des Gehaltes von proteingebundenen Zuckern, unter ihnen der Fucose, an. Ebenso SCHULTZE (70), der in seiner Arbeit auch verschiedene Einzelbestimmungen aus der Literatur zusammenstellte. Die letztgenannten Arbeiten beziehen sich alle auf Untersuchungen im Serum. Zusammen mit seinen Mitarbeitern SCHMIDTBERGER und HAUPT analysierte SCHULTZE (71) verschiedene Serumproteinfraktionen und berichtete über die Verteilung der Zucker in ihnen. In den papierchromatographischen und spektrophotometrischen (nach Dische) Bestimmungen hatte Fucose in den Gamma-Globulinen die höchsten Werte. MICHEEL und SUTHAUS (58) isolierten Glycoproteide aus Rinder-Gamma-Globulin und bestimmten die Anteile der einzelnen Zucker. Es ergab sich: Hexosamin : Galactose : Fucose : Mannose wie 4 : 2 : 1 : 4. Aus einer Orosomucoidfraktion setzten WINZLER, INOUE und LEVIN die einzelnen Zucker durch Hydrolyse frei und stellten fest, dass Fucose schon nach 15 Minuten zu 100 % freigesetzt wurde. LAURELL und WALDENSTROEM (52) untersuchten den Kohlehydratgehalt verschiedener Seren von Patienten mit Myelom, Makroglobulinaemien, lymphatischen Leukämien und anderen Krankheitsbildern, und stellten starke Abweichungen von dem normalen Gehalt an proteingebundenen Zuckern, besonders auch der Fucose, fest. Sie schlossen daraus auf Strukturunterschiede der elektrophoretisch abnormen Serumfraktionen.

VERSCHIEDENE METHODEN DER FUCOSEBESTIMMUNG IN DER LITERATUR

Zum Nachweis und zur Bestimmung der D- und L-Fucose wurden - neben den chemischen Reaktionen durch Überführung in die charakteristischen Hydrazone, die oben bei den chemischen Eigenheiten der Zucker angegeben wurden - hauptsächlich Methoden benutzt, die auf ihrer Überführung in Methylfurfurol aufbauen. Die chemischen Vorgänge hierbei sollen bei der Beschreibung der in dieser Arbeit angewandten spektrophotometrischen Methode geschildert werden. Im Folgenden sollen nur die bekanntesten dieser Methode angeführt werden.

Eine gravimetrische Art der Bestimmung ist die von KRÜGER und TOLLENS (47) und WIDTSOE (99) angegebene, welche auf der Umsetzung des gebildeten Methylfurfurol mit HCL und Phloroglucin beruht. Sie ist, wie auch alle folgenden, nicht für Fucose spezifisch, sondern zeigt ebenso andere Pentosen und Methylpentosen an.

Ebenfalls zum Methylfurfurolnachweis wurde eine Fällungsreaktion mit Barbitursäure oder Thiobarbitursäure beschrieben (36).

H. H. IDDLES und K. S. FRENCH gaben eine andere an, in der die in Methylfurfurol umgewandelte Fucose in 2, 4-Dinitrophenylhydrazon überführt wird, das quantitativ gefällt wird (39).

WINDAUS (100) entwickelte ein Verfahren, das gebildete Methylfurfurol durch Oxydation mit Chromsäure in Acetaldehyd zu spalten, und dieses dann mit p-Dinitrophenylhydrazin nachzuweisen.

Zum papierchromatographischen Nachweis beschrieb WALDRON (95) eine Methode. Dabei werden die Chromatogramme mit Perjodat behandelt. Es entsteht dabei Acetaldehyd. Dieser wird durch spezielle Farbreaktionen nachgewiesen, die durch Besprühen mit einem Gemisch von 1. Nitroprussid-Na, 2. Piperazin und 3. Glycol entstehen. - Die Fucose unterscheidet sich von anderen (Methyl-)Pentosen durch ihren R_f -Wert.

Zur gleichen Zeit, in der die vorliegende Arbeit entstand, wurden von Esther SCHMID Untersuchungen über "qualitative Bestimmungen der gebundenen Serumeiweisszucker Glactose, Mannose und Fucose mit Hilfe der Papierchromatographie" im Eiweisslabor der I. Med. Univ.-Klinik München ausgearbeitet (persönliche Mitteilung). Dabei wurden auch von einigen vorher spektrophotometrisch in ihrem Fucosegehalt bestimmten Seren, Fraktionen und Paraproteinen Chromatogramme angefertigt, auf denen Fucose neben den anderen Zuckern nachgewiesen werden konnte.

Der Vorgang des Verfahrens war folgender:

Die (Alkohol-)Eiweissfällung wurde in n NaOH gelöst, durch $8n$ HCL auf 2-Normalität gebracht und 12 Stunden im Wasserbad bei 100° hydrolysiert. Ausfallende braune Huminkörper wurden mit Glasfaserpapier z.T. abfiltriert. Die bei der Hydrolyse im Serum entstehenden Salze wurden mittels Kationenaustauscher Dowex 50 entfernt. Einengung der Lösung im Gefriervakuum und durch Abdampfen der Flüssigkeit im Luftstrom bis auf 0,1 ml.

Von einer Serumausgangsmenge von 2 ml wurden nun $2 \times 0,01$ ml der erhaltenen Lösung auf das Papier aufgetragen. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch nach Partridge (Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 5 : 1), das 3 Tage lang durch das Chromatogramm lief.

Die Entwicklung erfolgte mit Anilinphtalat. Die Zucker, die jeweils mit einem Testlösungsgemisch liefen, liessen sich als bräunliche Flecken nachweisen.

Spektrophotometrische Methode

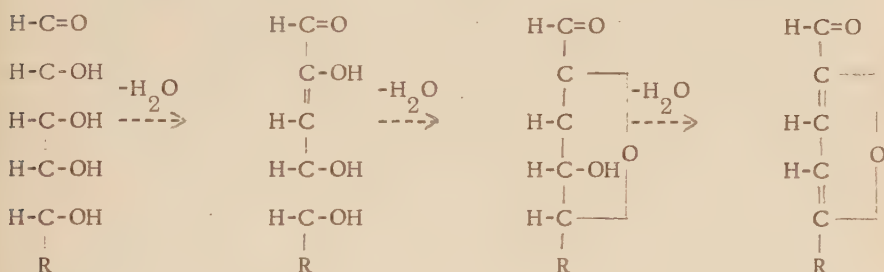
In letzter Zeit wurden zur Fucosebestimmung colorimetrische bzw. spektrophotometrische Verfahren angewandt, die sich durch ihre relative Einfachheit besonders für Bestimmungen in klinischen Untersuchungen empfehlen. Da auch die in dieser Arbeit angewandte Methode dazu zählt, ist es nötig, ihre Grundlagen kurz darzustellen (81).

Ihr Prinzip ist die schon im Vorigen erwähnte Umwandlung der an Serumeiweisskörper gebundenen Fucose in Methylfurfurol mittels Einwirkung von Mineralsäuren (wobei die glycosidische Bindung anscheinend gar nicht einmal in jedem Fall gelöst zu werden braucht). Methylfurfurol wird dann mit bestimmten Reagenzien in eine gefärbte Lösung mit charakteristischen Absorptionsspektren überführt, welche mittels der Spektrophotometrie erfasst werden können. Dieser Prozess gliedert sich damit deutlich in zwei auch zeitlich voneinander getrennte Teile, 1. einem chemischen, die Umwandlung in Methylfurfurol, 2. einen physikalischen, die spektrophotometrische Messung.

Ad 1.: Um zunächst die Grundlage des ersten zu erläutern, kann man auf die Molisch - Reaktion hinweisen (59), nach welcher Zucker bei Anwesenheit von α -Naphthol mit H_2SO_4 konz. eine tief bläulich-rote Farbe bilden. UDRANSKY (88) wies nach, dass die Farbtiefe dem Zuckergehalt proportional ist und baute darauf eine quantitative Zuckerbestimmung im Harn auf. Farbverbindungen, die durch den Abbau von Zuckern mittels starker Säuren bei Anwesenheit bestimmter Phenole entstanden, sind lange Zeit ein qualitativer Nachweis für Kohlehydrate gewesen; für Pentosen (und Hexuronsäure) z.B. in Form von BIAL's (4) Orcinol-

und TOLLEN's Naphthoresorcinol - Reaktion. Die allen diesen Reaktionen zugrundeliegenden Vorgänge sind in chemischer Hinsicht folgende (36):

Pentosen gehen beim Erhitzen mit Mineralsäuren in Furfurol über. Hexuronsäuren spalten unter gleichen Bedingungen CO_2 ab und reagieren dann wie Pentosen. Ketopentosen liefern nur sehr wenig Furfurol. Aus Hexosen entsteht 5-Oxymethylfurfurol, das in Ameisensäure und Lävulin zerfällt, die beide in der weiteren Reaktion meist von Furfurol unterschieden werden können. Methylpentosen werden zu 5-Methylfurfurol (siehe Formeln).



R = H : Pentose $\text{--}\rightarrow$ Furfurol

R = CH_3 : Methylpentose $\text{--}\rightarrow$ Methylfurfurol

R = CH_2OH : Hexose $\text{--}\rightarrow$ Oxymethylfurfurol

Diese Furfurolaldehyde und ihre homologen Verbindungen - Methyl - und Methylhydroxyfurfurolsäuren - ergeben durch Polymerisation und Kondensation der Aldehyde selbst oder ihrer Spaltprodukte mit Phenolen, Aminen und bestimmten Sulfhydryl-Gruppen Farbverbindungen, die entsprechend den ihnen in der Reaktion zugrundeliegenden Zuckern charakteristische Absorption zeigen. Schon die Furfurolverbindungen ohne Farbreaktivate haben in H_2SO_4 kennzeichnende Absorptionsspektren, die für Furfurol und Hydroxymethylfurfurol ein Maximum unter $\lambda = 300 \text{ m}\mu$ haben. Methylfurfurol dagegen weist ein Maximum bei $\lambda = 330 \text{ m}\mu$ auf. Derivate, die von Heptosen gebildet werden - hauptsächlich Hydroxymethylfurfurol - zeigen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 405 \text{ m}\mu$ (18).

F. H. NEWTH (62) schreibt in seiner Arbeit über die Bildung von Furfurol-Verbindungen aus Zuckern, dass die Folge der Reaktionen, die zur Furfurol-Ringbildung führt und in deren Verlauf 3 Moleküle Wasser eliminiert werden, nicht genau bekannt ist. Neben dem oben angegebenen Weg gibt er noch andere Möglichkeiten an.

Zu den Farbprodukten der weiteren Reaktionen meint er, es sei unwahrscheinlich, dass sie von den Furfurol-Verbindungen selbst hervorgerufen würden. Vielmehr

würden sie durch die Säurewirkung weiter abgebaut zu Substanzen, die ihrerseits für die jeweiligen Zucker spezifische Farbprodukte lieferten.

Für die Mikrobestimmung von einzelnen Zuckern auf colorimetrischem oder spektrophotometrischem Wege wurden viele Reaktionen angegeben, die auf dieser Grundlage beruhen.

Die in dieser Arbeit benutzte Methode wurde von DISCHE (17, 18, 19) beschrieben, der auch für die übrigen Zucker, soweit sie von biologischem Interesse sind, weitere geeignete angibt. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass die Absorptionsspektren der Zucker besonders günstig für eine Bestimmung der Fucose liegen. In ihr wird das vorliegende Material (in unserem Falle Serumweiß) mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt und anschliessend mit CYSTEIN versetzt. Darauf entstehen durch Kondensation oder Polymerisation mit dem Methylfurfurol die erwähnten Farbverbindungen mit Absorptionsspektren, die für jeden Zucker spezifisch sind. Zwar bilden auch die übrigen am Eiweiss oder sonst glykosidisch gebundenen Zucker (mit Ausnahme der Hexosamine) bei dieser Reaktion gefärbte Endprodukte, doch haben ihre Absorptionsspektren im Bereich der maximalen Extinktionswerte der Fucose nur geringe eigene Extinktion. Auch wechselt die Geschwindigkeit, mit der diese Endprodukte gebildet werden, von Zucker zu Zucker und ebenso ihre Stabilität. Da durch die Einwirkung der Schwefelsäure u. U. schon mit dem organischen Untersuchungsmaterial - auch mit Serum - allein (ohne die Farbreaktoren) gefärbte Verbindungen gebildet werden können, die in dem in Frage kommenden Absorptionsbereich interferieren, muss man eine Kontrollreaktion ohne Farbreaktoren (Leerwert) bei jeder Bestimmung mitlaufen lassen und ihre Extinktion von der vom Untersuchungsmaterial erhaltenen subtrahieren.

Wie schon erwähnt, ist bei diesen Reaktionen - im Unterschied zu denen, die auf der Aldehyd-Natur der Zucker beruhen - eine vorherige Hydrolyse nicht nötig, da die Methylfurfurol-Bildung (und weitere Farbreaktionen) auch bei bestehender Glykosidbindung vor sich geht.

Ad 2.: Der physikalische Teil der Methode ist eine spektrophotometrische Bestimmung der durch die chemische Reaktion (s. o.) gebildeten, gefärbten H_2SO_4 -Lösung.

Das zugrunde liegende Prinzip ist das Lambert-Beer'sche Gesetz. Dieses besagt, "dass bei (verdünnten) Lösungen der Logarithmus der reziproken Durchlässigkeit der (von einem Lichtstrahl durchsetzten) Schichtdicke und der Konzentration des absorbierenden Stoffes proportional ist" (46).

Als bekannt wird vorausgesetzt, dass ein Teil der Intensität eines Strahlenbündels, das ein Medium durchsetzt, - in diesem Falle die Lösung - von diesem absorbiert wird.

Bezeichnet man den in das absorbierende Medium eintretenden Lichtstrahl als I_0 , den austretenden als I , so wird der Quotient $\frac{I}{I_0} = D$ als Durchlässigkeit oder Durchlässigkeitsgrad definiert. (Der auf I_0 bezogene, durch Absorption bedingte Verlust von Energie, wird als Absorptionsgrad a bezeichnet; siehe Formel).

$$\frac{I_0 - I}{I_0} = 1 - \frac{I}{I_0} = a; \quad a + D = 1$$

Durchlässigkeit (und Absorptionsgrad) hängen von der Wellenlänge der Strahlung ab, die man als Index D_λ (a_λ) hinzufügt. Den Logarithmus der reziproken Durchlässigkeit nennt man Extinktion E . Es ist $E = \log \frac{1}{D} = \log \frac{I_0}{I}$. Sie ist die eigentliche (dimensionslose) Messgröße bei allen photometrischen Verfahren. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist sie also der durchlaufenden Schichtdicke d und der Konzentration c proportional. Es gilt:

$$\log \frac{I_0}{I} = E = e \cdot c \cdot d,$$

e ist dabei der molare Extinktionskoeffizient, der bei monochromatischem Licht und verdünnten Lösungen konstant ist. (Diese Konstanz wurde für die Methode der vorliegenden Bestimmungen dadurch erwiesen, dass in einer Eichkurve (s. Anhang A III) von Lösungen mit steigender Konzentration $E = f(c)$ sich als Gerade darstellte, ferner bei allen Messungen Vergleichslösungen bekannter Konzentration mitliefen (18, 46). Misst man die Extinktion der betreffenden Lösung bei monochromatischem Licht und immer derselben Schichtdicke d , so ist E allein der Konzentration c der Lösung proportional, lässt sich also für Konzentrationsbestimmungen verwenden.

Die Voraussetzung des monochromatischen Lichtes wurde durch die Messinstrumente - Beckman Spektrophotometer Typ DU (Spektralkurvenselbstschreiber) und Zeiss Spektralphotometer - gegeben. Diese Instrumente haben Monochromatoren, die das Mischlicht der Lichtquelle mittels Quarzprismen in sein Spektrum zerlegen und die gewünschte Wellenlänge, die auf einer Skala eingestellt werden kann, durch ein kompliziertes optisches System isolieren. Das Licht dieser bestimmten Wellenlänge wird dann durch einen veränderlichen Spalt durch die zu messende Lösung geschickt. Diese wird durch Glaströge (Kuvetten) mit konstantem Durchmesser in den Lichtstrahl gebracht. Die Registrierung der Durchlässigkeit bzw. Extinktion der Lösung erfolgt über Photozellen und elektronische Verstärker durch ein für Durchlässigkeit D und Extinktion E geeichtes Galvanometer. (Stark vereinfachte Darstellung!)

Die erforderliche Konstanz der Schichtdicke d wird dadurch erreicht, dass die Lösungen immer in den gleichen ausgemessenen Kuvetten gemessen werden. (Das Zeiss Spektralphotometer, an dem die Konzentrationsbestimmungen ausschliesslich ausgeführt wurden, besitzt (wie auch das Beckman Selbstschreibegerät) einen Kuvettenhalter für 4 Kuvetten, die auf einem Schlitten jeweils zur einzelnen Messung in den Strahlengang gezogen werden.) Mit dem Beckman-Spektralkurvenschreiber wurden lediglich die Absorptionskurven für Fucose, Galactose und Mannose aufgenommen. Bei Vergleichsmessungen mit Eichlösungen zeigten die beiden Instrumente aber gleiche Ergebnisse.

Der Messvorgang besteht darin, dass alle Extinktionsbestimmungen der Farblösungen bezogen werden auf maximale Durchlässigkeit ($D = 100\%$, $E = 0$) des Lösungsmittels ($\text{NaOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{Leerwert}$). Dadurch wird erst die Konzentrationsbestimmung der Zucker möglich, da diese ja der Extinktion proportional ist.

Wenn man bei der in dieser Arbeit benutzten Cystein - Schwefelsäure - Reaktion die Extinktion misst und die Absorptionsspektren mit dem Beckman Gerät DU aufnimmt, zeigt sich, dass Fucose ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 396 \text{ m}\mu$ besitzt (60) (s. Absorptionskurven, Anhang A IV). Galactose und Mannose, die bei der Bestimmung im Serumeiweiss hauptsächlich noch vorkommen und als Quelle einer Verfälschung dieses Maximums in Frage kämen, zeigen an dieser Stelle, auch wenn sie im Überschuss vorliegen, kaum eigene Extinktion (s. Kurve, Anhang A IV). Wenn man also das Maximum bei $\lambda = 396 \text{ m}\mu$ bestimmt und dagegen einen Wert hält, der von der Absorption bei einer Wellenlänge im Niveau der Fucosekurve, z.B. $\lambda = 430 \text{ m}\mu$ hervorgerufen wird, so ist die Differenz $\Delta E_{\lambda 396 - 430 \text{ m}\mu}$ der Konzentration der Fucose direkt proportional. Ausserdem sind die beiden Wellenlängen so gewählt, dass eventuell interferierende Hexosen sowohl bei $\lambda = 396 \text{ m}\mu$, als auch bei $\lambda = 430 \text{ m}\mu$ dieselbe Extinktion zeigen, sodass bei ihnen $\Delta E = 0$ wird. Diese Art der Messung wird als "2-Wellenlängen-Messung" (Dichromatic-readings, (18)) bezeichnet, und liefert durch Vergleich mit der (Eich-)Stammlösung die direkten Werte des vorliegenden Fucosegehaltes.

Im Folgenden wird die Vorbereitung der Farblösung aus dem Serum, wie sie von DISCHE und SHETTLES (17) für Methylpentosen angegeben wurde, mitgeteilt. Sie wurde in einigen Punkten nach eigenen Untersuchungen zur Methode, die später angegeben werden, abgeändert. Ebenso wird an Beispielen die Auswertung der Messergebnisse gezeigt.

VORGANG DER BESTIMMUNG VON METHYLPENTOSEN (ABGEÄNDERT NACH DISCHE UND SHETTLES)

Reagenzien:

1. Äthanol 96 %ig
2. 27,8 n H_2SO_4 (hergestellt aus 6 Vol. H_2SO_4 (D = 1,84) + 1 Vol. H_2O bidest.)
3. n/10 NaOH p. A. Merk
4. Cysteinreagens (3 %ige wässrige Lösung von Cystein. hydrochlor.)
5. Fucose-Stammlösung (10 mg %ige wässrige Lösung von L-Fucose, Fa. Schuchardt, München. In 0,1 ml dieser Lösung ist also 10 μ g Fucose!).

Durchführung der Serumpräparation:

Um die Berechnung des Gehaltes an Fucose im Serum - wo sie als einzige Methylpentose vorkommt! - vornehmen zu können, muss man folgende Werte kennen:

1. den Extinktionswert des Serums nach erfolgter chemischer Reaktion.
2. den Extinktionswert des Serum + Fucose (sogen. "internal standard" (17, 18)). Es wird bei der Besprechung der Versuche zur Methode noch auseinanderzusetzen sein, warum die (Eich-)Stammlösung zum Serum selbst zugegeben wurde.
3. den Extinktionswert des Serum ohne Cystein (sogen. Serumleerwert). Dieser ist nötig, um unspezifische Farbreaktionen zu erkennen und zu eliminieren, die durch Reaktion der Schwefelsäure allein mit dem Serum entstehen und die die durch die Fucose - Reaktion bedingte Extinktion verfälschen können. Als 4. Fraktion nimmt man noch das Lösungsmittel ($\text{NaOH} + \text{H}_2\text{SO}_4$) dazu, das den "Nullwert" des ganzen Systems darstellt.

Vorgang:

Für jeden der drei oben genannten Werte wird in je 3 Schliffgläschen 0,05 ml Serum (bei niedriger Eiweisskonzentration 0,1 ml Serum) einpipettiert, anschliessend in alle 9 Gläser 5 ml 96 %iger Alkohol zur Fällung des Serumeiweiss.

Die Fällung bleibt mit Alkoholüberstand 20 Min. stehen; dann zentrifugiert man 20 Min. bei 4000 U.p.M.

Der Alkoholüberstand wird vorsichtig vom Niederschlag abgesaugt.

Den Niederschlag in den Flaschen für Serum + Fucose löst man mit 0,9 ml, in allen anderen mit 1,0 ml n/10 NaOH auf. In ein Leerglas gibt man ebenfalls 1,0 ml NaOH für den Nullwert.

Zu den Gläschen für Serum + Fucose (internal standard) fügt man 0,1 ml der 10 mg %igen Fucosestammlösung.

In alle Gläser wird dann (auch zum NaOH-Leerwertglas) unter ständigem Kühlen in Eiswasser 4,5 ml der Schwefelsäure einpipettiert.

Anschliessend schüttelt man alle Gläser zunächst ohne Stöpsel, kühlt erneut in Eiswasser, schüttelt wieder, nachdem die Schliffstöpsel aufgesetzt wurden, und kühlt wieder in Eiswasser. (Die gründliche Durchmischung ist für diese Reaktion äusserst wichtig!) Dann werden die Gläser auf Zimmertemperatur gebracht.

Darauf werden sie 10 Min. lang in ein kochendes Wasserbad gestellt; anschliessend kühlt man sie unter Leitungswasser ab.

In die Gläser mit Serum ohne Cystein (Serumleerwert) gibt man nun 0,1 ml Aqua dest., in alle anderen 0,1 ml des Cystein - Reagens.

Dann schüttelt man wieder längere Zeit gründlich!

Die ganze Serie wird im Folgenden 5 Stunden in ein (abgedunkeltes) Wasserbad gebracht.

Vor dem Messen werden die Gläschen durch zweimaliges vorsichtiges Umdrehen nochmals durchmischt. Dabei muss aber vermieden werden, dass sich Luftblasen bilden, weil sie die nachfolgende Messung stören können.

In der folgenden Messung wird die Extinktion für jede Probe gegen den (NaOH-H₂SO₄-)Lösungsmittel-Nullwert bestimmt, und zwar einmal bei der Wellenlänge = 396 mμ, zum anderen bei = 430 mμ.

Die Proben wurden alle in (d=) 5 mm-Kuvetten des Zeiss-Spektralphotometer gemessen.

Zur Auswertung der 3 Fraktionen: 1. Serum + Cystein, 2. Serum + Fucose + Cystein (internal), 3. Serum ohne Cystein (Serumleerwert). Für die Berechnung werden nur solche Werte benutzt, bei denen die Extinktion in allen 3 parallel laufenden Proben gleich ist oder nur in geringen Differenzen sich bewegt; im letzten Fall wird gemittelt. Fällt nur ein Wert aus der Reihe, was bei den nicht kontrollierbaren chemischen Umsetzungen leicht vorkommen kann, so kann er nicht verwertet werden; u. U. muss die ganze Bestimmung wiederholt werden.

Berechnung:

Von den gemittelten Einzelwerten wird für jede Fraktion $\frac{E_{396} - E_{430}}{E_{430}}$ gebildet.

Die Differenz aus:

(Serum mit Cystein) - (Serum ohne Cystein) = reduzierter Serumwert.

(zur Vermeidung Fucose-unspezifischer Farbreaktionen)

Die Differenz aus:

(Serum + Fucose + Cystein = internal) - (Serum + Cystein) = Wert für
10 : Fucose (der Eich-Stammlösung)

$\frac{\text{reduz. Serumwert} \cdot 2}{\text{Wert für 10 Fucose}} \cdot 10 = \text{Fucosegehalt des Serums (in mg \%)}.$

Im Folgenden werden zwei Beispiele von Fucosebestimmung im Serum gegeben. Von den übrigen Seren und Serumfraktionen werden dann nur noch die berechneten Ergebnisse mitgeteilt, da die Zwischenwerte ja ohne weiteres Interesse sind. Zudem würde ihre Mitteilung unverhältnismässig viel Platz in Anspruch nehmen, der in keinem Verhältnis zu ihrer Bedeutung stehen würde.

Berechnungsbeispiele für Serumbestimmung:

Patientin Pf., Morbus Waldenstroem

mu	Serum + Cystein						Serum + Fucose				Serum ohne Cystein		
396	655	665	664	665	664		762	761	760	765	338	340	340
430	278	288	286	287	285		294	293	291	296	247	250	250
	377	377	378	378	379		468	468	469	469	91	90	90
			377,8						468,5			90,3	

reduzierter Serum-Wert: $287,5^x$

10 : Fucose des internal: 90,7

Fucose des Serums: 31,7 mg %

(x Serumausgangsmenge 0,1 ml)

Patient Mgd., akute Polyarthritis

mu	Serum + Cystein				Serum + Fucose			Serum ohne Cystein		
396	237	237	238		338	332	338	122	120	120
430	97	97	98		108	102	108	61	59	60
	140	140	140		230	230	230	61	61	60
									60,7	

reduzierter Serum-Wert: $79,3 \cdot 2^x$

10 : Fucose des internal: 90,0

Fucose des Serums: 17,62 mg %

(x Serumsausgangsmenge 0,05 ml)

(Die angegebenen Extinktionswerte verstehen sich als das 1000-fache der gemessenen, also 655 = 0,655; 97 = 0,097. Diese Schreibung erfolgte nur aus Gründen der Übersicht).

VERSUCHE ZUR METHODE

1. Eichkurven (s. Anhang A III):

Um nachzuweisen, dass bei der vorliegenden Reaktion für die gebildete Farblösung wirklich das Lambert - Beer'sche Gesetz gilt, somit also die Voraussetzung für eine Konzentrationsbestimmung nach dem angegebenen Verfahren gegeben ist (siehe vorne), wurden die Extinktionen von Eichlösungen mit ansteigender Fucosekonzentration gemessen.

Auf der 1. Kurve sind die Ergebnisse dargestellt, die von drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen stammen. (Sie wurden am Beckmann-Spektrophotometer DU gemessen.) Reihe A und B steigen in dem Fucosegehalt um je 10 μ an in einem Bereich von 10 - 40 μ . Reihe C steigt um je 20 μ an in einem Bereich von 20 - 100 μ . Wie man leicht ablesen kann, verläuft die Kurve über einem Bereich von 1 - 60 - 70 μ als Gerade und weicht bei den höheren Konzentrationen geringfügig ab.

Die 2. Kurve enthält die Werte einer Messung, die von einem Konzentrationsanstieg von 5, 10, 20, 30 μ erhalten wurden. (Diese Bestimmungen wurden am Zeiss-Spektralphotometer vorgenommen.) Ihre Kurve stellt sich streng als Gerade dar. Das heisst also: $E = f(c)$.

Wenn man berücksichtigt, dass die Serum-Fucose-Konzentrationen maximal bis ca. 35 μ (Serumausgangsmenge 0,05 - 0,1 ml!) bestimmt wurden, ferner immer eine Fucose-Vergleichsstandard-Lösung mit 10 μ parallel lief, so sind damit die Bedingungen der Methode erfüllt.

2. Spektralkurven (s. Anhang A IV):

Mit dem registrierenden Spektrophotometer von Beckman, Modell DU, wurden die Spektralkurven von reiner Fucoselösung, gleichzeitig mit Galactose und Mannose, den in Serumproteiden vorkommenden Hexosen, aufgenommen. Ausserdem die Spektren eines nach der Methode behandelten Serums sowie eines Serums + Fucose (internal standard). Dabei konnten die Angaben von Dische und Shettles (17, 18), welche die Grundlagen für dieses Nachweisverfahren bilden, vollauf bestätigt werden. In der ersten Kurve wurden die Absorptionsspektren von 10 μ Fucose gegen die von je 50 μ Mannose und Galactose aufgezeichnet. Es zeigt sich, dass die beiden ebenfalls im Serum vorkommenden Hexosen parallel verlaufen und beide ein schwaches Maximum bei $\lambda = 410 \text{ m}\mu$ aufweisen, welches aber zu $\lambda = 396 \text{ m}\mu$ symmetrisch liegt. Die $\Delta E_{396 - 430 \text{ m}\mu}$ wird also = 0. Fucose dagegen liefert bei 396 m μ ein steiles Maximum in der Absorptionskurve, während ihre bis $\lambda = 360 \text{ m}\mu$ und wieder ab $\lambda = 430 \text{ m}\mu$ gemessenen Extinktionswerte ein gleichmässiges Niveau nahe $E = 0$ zeigen.

Die zweite Kurve bringt nebeneinander die Absorptionsspektren von reiner Fucose-Stammlösung, einer Serumfraktion und eines Serum + Fucose (internal standard). Dabei zeigt erstere wieder die eben besprochenen Eigenheiten, während die Serumlösung und die aus Serum + Fucose ihre Maxima genau darüber aufbauen und auch sonst im Bereich von $\lambda = 360 - 430$ sich völlig identisch wie die reine Fucoselösung verhalten, mit dem Unterschied natürlich, dass sie auf einem höheren Niveau liegen, entsprechend ihrem grösseren Fucosegehalt.

3. Extinktionswertmessung über längere Zeiträume (s. Anhang A V):

Da in der Literatur zum Teil widersprechende Angaben darüber zu finden waren, nach welchem Zeitabschnitt nach erfolgter Cysteingabe die Extinktionswertmessungen ausgeführt werden sollten, musste die Frage geklärt werden, ob und in welchem Umfang sich das gebildete Reaktionsprodukt unter der Zeit ändert. Nach DISCHE (18) bleibt die durch Fucose bedingte grün-gelbliche Farbe der H_2SO_4 -Cystein-Reaktion innerhalb von 24 Stunden konstant. Andererseits empfahl er aber eine Ablesung schon eine Stunde nach Cysteingabe (17). SCHULTZE und Mitarbeiter (71) machten in ihrer Arbeit die Messungen 2 1/2 Stunden danach.

In einem Ablesungszeitabschnitt, der sich über 24 h erstreckte, wurde nun an den für die Berechnung in Frage kommenden Fraktionen die Extinktionen über ein Spektrum von $\lambda = 330 - 700$ m μ gemessen und Kurvenmässig dargestellt. Die Messungen wurden von 1 - 10 Stunden stündlich und dann nochmals in der 23. Stunde durchgeführt. Folgende Messlösungen lagen dabei zugrunde (die eingeklammerten Zahlen entsprechen der graphischen Darstellung.):

Serum + Fucose (2); Serum + Cystein (3); Fucosestammlösung (5); Serum ohne Cystein (7). Ebenfalls dargestellt wurden die aus ihnen abgeleiteten Werte: internal standard (4); reduzierter Serumwert (6) und der berechnete Fucosegehalt (1). Bei der Auswertung zeigte sich dann:

Die Extinktionswerte für "Serum + Cystein (3)" blieben während der ganzen Zeit sehr konstant, wie das je auch von DISCHE (18) beschrieben wurde.

Der von "Serum ohne Cystein (7)" stieg bis zur 4. Stunde mässig, danach noch geringfügig an.

Der "reduzierte Serumwert (6)" ((Serum + Cystein) - Serum ohne Cystein)) fiel demzufolge bis zur 4. Stunde mässig, dann kaum noch ab.

Beide Fucosewerte, sowohl der der "reinen Fucoselösung (5)", als auch der auf "Fucose reduzierte Wert des "internal standard (4)"" ((Serum + Fucose + Cystein) - (Serum ohne Fucose + Cystein)), stiegen bis zur 3. Stunde stark, in der 3. noch

deutlich, von der 4. an aber nicht mehr an. Dabei liegt der für das internal standard (4) "berechnete Anstieg über dem der reinen Fucoselösung (5). Von der 5. - 7. Stunde liegen die Werte für beide zusammen. Danach fällt der für das internal (4) leicht ab, während die reine Lösung konstant bleibt.

"Serum + Fucose + Cystein (2)" stieg auf Grund des Verhaltens der Fucose sogar bis zur 5. Stunde erheblich an, um dann während 2 Stunden auf gleicher Höhe zu bleiben und anschliessend geringfügig abzufallen.

Am meisten beachtenswert ist aber, dass der "berechnete Fucosewert (1)", in den alle gemessenen Extinktionen eingehen (2, 3, 5 und 7), bis zur 4. Stunde stark abfiel, von der 5. Stunde an aber praktisch konstant blieb.

Für alle Lösungen entsprach der 23-Stunden-Wert dem 10-Stunden-Wert.

Auf Grund der bei diesen Untersuchungen erhaltenen Feststellungen, dass alle Fraktionen nach 5 Stunden ihren Extinktionsgipfel der λ E 396 - 430 erreicht haben und für lange Zeit konstant bleiben, wurde die Ablesungszeit auf diesen Zeitpunkt (5 Stunden nach Zugabe des Cysteins) festgesetzt.

4. Internal Standard:

In Versuchen, die wir zum Vergleich der Extinktion reiner Fucoselösungen und solcher, die zu einem Serum gegeben wurden (internal standard), anstellten, ergaben sich zwischen den beiden Fraktionen Differenzen, wenn auch geringe. DISCHE und SHETTLES (17) erwähnten die Erscheinung, dass biologisches Material imstande sein kann, die Extinktionswerte für Methylpentose zu erhöhen oder zu erniedrigen. In den erwähnten Untersuchungen (s. Anhang A V: Extinktion-Zeit-Kurve) zeigte sich nun, dass die internal-Werte in den ersten 6 Stunden durchweg höher lagen. Daher wurde grundsätzlich in allen Bestimmungen des Fucosegehaltes in Serumproben ein "internal standard" und nicht freie Fucoselösung als Bezugswert genommen, um aus dieser Differenz stammende Fehlerquellen von vornherein auszuschalten.

Statt einer 2 mg %igen Fucosestandardlösung, wie sie WINZLER (101) empfiehlt, - die Fraktion enthält dann, wenn ein ml dieser Lösung als Ausgangsmenge genommen wurde, 20 μ g Fucose; - wurde eine 10 mg %ige verwandt, von der 0,1 ml = 10 μ g als Vergleichsmenge in die Serumproben für das internal standard eingegeben wurde. Damit erhält man Eichmengen und -werte, wie sie bei normalem Fucosegehalt des Serums vergleichbar vorliegen. Ausserdem vereinfacht sich dadurch die Berechnung etwas.

5. NaOH - H_2SO_4 - Nullwert:

Nach DISCHE und SHETTLES (17) und WINZLER (101) sollen alle Lösungen gegen H_2O als Bezugswert (Nullpunkt der Extinktion) gemessen werden. Ferner sollte davon die $\Delta E_{396-430}$ abgezogen werden, die durch einen NaOH - H_2SO_4 - Leerwert zustande kommen. Diese Werte sind verständlicherweise sehr niedrig ($E = 0,001 - 0,005$). Nach eingehender Überprüfung zeigte sich, dass man bei Fucosebestimmungen in Serumproteiden, ohne dadurch Fehler zu bedingen, die NaOH - H_2SO_4 - Probe als Nullwert verwenden kann, gegen den alle anderen Fraktionen gemessen werden. Dadurch muss vom Serumwert nicht mehr zusätzlich die $\Delta E_{396-430}$ des NaOH - H_2SO_4 - Wertes subtrahiert werden, sondern nur noch die $E_{396-430}$, die aus "Serum ohne Cystein" erhalten wird.

6. Küvetten:

Um die Extinktion der Lösungen in einem Bereich von $E = 0,5 - 0,05$ (grösste Registriergenauigkeit des Messinstrumentes) zu bekommen, wurde die Serumsausgangsmenge abweichend von WINZLER (101), der 0,1 ml nimmt, auf 0,05 ml festgesetzt. (Nur bei sehr geringprozentigem Eiweisssgehalt eines Serums wurde 0,1 ml genommen). Aus dem gleichen Grunde wurden statt der vom gleichen Autor vorgeschlagenen 10 - mm - Kuvetten solche von $d = 5$ mm genommen.

7. Kochzeiten:

DISCHE (18) hatte für die Cystein - H_2SO_4 - Reaktion für Methylpentose eine 3- bzw. 10 minütige Kochzeit angegeben. Nach seinen Untersuchungen unterschieden sich in diesen von ihm CyR3 bzw. CyR10 genannten Verfahren hauptsächlich die Absorptionsspektren der begleitenden Hexosen und anderen Zuckern. Von ihm wurde die CyR10 für Fucose empfohlen. In Versuchen, die sich über 3 - 13 Minuten Erhitzungszeit erstreckten, konnten keine wesentlichen Veränderungen der $\Delta E_{396-430}$ für Fucose festgestellt werden. Um eine Konstanz der Versuchsbedingungen in jedem Punkt zu erzielen, empfiehlt es sich, auf jeden Fall für Methylenpentosebestimmungen die CyR10 anzuwenden, da sie auch anhand der vorliegenden Versuche sich als sehr zuverlässig erwies.

8. H_2O - Effekt:

Zur weiteren Charakteristik eines Vorliegens von Methylpentosen im untersuchten Substrat gab DISCHE zusammen mit seinem Mitarbeiter SHETTLES (20) ein Verfahren an, nach welchem durch spätere Zugabe von H_2O das entstandene Reaktionsprodukt wieder zerstört wird. Dabei soll nach Zugabe einer bestimmten

Menge H_2O (1,2 ml) in einer bestimmten Zeit (4 Std.) nur noch ein Prozentsatz der vorher gemessenen $\Delta E_{396-430}$ vorhanden sein, der für Methylenpentosen immer der gleiche (40 %) sein soll. Nachdem dieses Phänomen der Zerstörung des Farbproduktes durch H_2O an zwei Seren bestätigt werden konnte, wurde in allen weiteren Fällen davon abgesehen, diese zusätzliche Reaktion durchzuführen, zumal sie mit erheblichen technischen Schwierigkeiten verbunden war, und ausserdem ja nur eine qualitative Bestätigung gab.

9. Technische Abänderungen:

WINZLER (101) schreibt vor, die abzentrifugierte Alkoholfällung des Serumeiweisses noch einmal in der gleichen Menge Alkohol zu suspendieren und abermals zu zentrifugieren. Da hierbei die Gefahr von mehr oder weniger stark in die Waage fallenden Verlusten gegeben war (durch Aufrühren des festhaftenden Niederschlages mittels Glasstabes!), wurde auf die zweite Alkoholwäsche - ohne Beeinträchtigung des Resultates - verzichtet. Die Gläser wurden ausserdem während des Erhitzens im Wasserbad mit Schliffstöpseln versehen. Auch wurde das Absaugen des Alkohols vom Niederschlag anstelle des von Winzler angegebenen Dekantierens vorgenommen.

ERGEBNISSE

VON FUCOSEBESTIMMUNGEN IM MENSCHLICHEN SERUM

Es wurden zunächst im Serum normaler Versuchspersonen Bestimmungen ausgeführt. Dafür wurden 20 gesunde Probanden beiderlei Geschlechts und unterschiedlichen Alters ausgesucht, welche anamnestisch keine wesentlichen entzündlichen Erkrankungen, Leberschädigungen oder andere Krankheiten von Bedeutung aufwiesen. Ferner wurden bei ihnen normale BSG und ein hochnormaler Elektrophoresebefund im Rahmen der klinischen Routine-Laboruntersuchungen festgestellt. Auch hatten sie sich längere Zeit vor der Untersuchung ganz gesund gefühlt.

Dabei wurde mit der beschriebenen Methode ein Gehalt an Fucose von

$$8,31 \pm 2,24 \text{ mg } \%^x$$

gefunden.

Die einzelnen Werte finden sich nebst denjenigen der BSG, des Gesamteiweisses und des Elektrophoresebefundes in einer Tabelle zusammengestellt (s. Anhang A VI).

Wenn man die für den einzelnen Fall gefundenen Fucosewerte auf das Gesamteiweiss des Serums bezieht, (letzter Spalte der Tabelle), so findet man eine sehr geringe Abweichung der Normalwerte von einem mittleren Wert:

Schwankungsbreite : 0,10 - 0,13 % des Gesamteiweisses.

^x Standardabweichung berechnet als 2σ.

ERGEBNISSE

VON FUCOSEBESTIMMUNGEN IM SERUM VON PATIENTEN MIT PARAPROTEINÄMIEN.

Sodann wurden Seren von Patienten mit Paraproteinämien untersucht, und zwar 10 Fälle von Plasmocytom und 3 Fälle von Makroglobulinämie (Morbus Waldenström), die alle sowohl klinisch als auch durch Laboratoriumsuntersuchungen wie Papierelektrophorese und z. T. durch Bestimmung der Eiweissfraktionen mit der Ultrazentrifuge gesichert waren.

1. Plasmocytom-Seren

Dabei fand sich bei den 12 Plasmocytomen jedesmal eine Erhöhung der in mg % berechneten Fucosewerte im Serum, die eindeutig über die berechnete Standardabweichung (2 σ) der Normalseren hinausging (s. o. und vergl. Anhang A VI und A VII). Auch wenn man die Fucose auf den Gesamteiweissgehalt des Serums bezog, fanden sich Werte, die über der Schwankungsbreite lagen, die für Normalseren mit 0,10 - 0,13 % errechnet war.

2. Makroglobulinämie - Seren

Bei den 3 Makroglobulinämien zeigten sich im Serum gegenüber den Fucosewerten, die bei Normalen und auch bei den Plasmocytomfällen bestimmt waren, sowohl bei Berechnung in mg %, als auch bei Bezug auf das Gesamteiweiss des Serums erheblich höhere Werte, die das Doppelte bis Dreifache des in Normalseren ermittelten Wertes betrugten (s. Anhang A VIII).

Schon bei dieser Fucosebestimmung im ganzen Serum zeigten sich also charakteristische Unterschiede des Serum - Fucose - Gehaltes von normalen Probanden, Plasmocytomen und Makroglobulinämien an.

ERGEBNISSE

VON FUCOSEBESTIMMUNGEN IN SERUM- FRAKTIONEN

Erheblich deutlicher und signifikanter wurden die Unterschiede aber bei der Untersuchung von bestimmten Proteinfraktionen.

Diese Fraktionen wurden mit einem Verfahren gewonnen, das von Dr. M. Knedel und F. Sperl im Eiweisslabor der I. Med. Univ.-Klinik ausgearbeitet wurde (persönliche Mitteilung)^x. Es handelt sich dabei um eine Methode der präparativen Zonenelektrophorese mit Kartonpapier als Trägermaterial, die sich besonders gut zur Gewinnung von Fraktionen aus Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten eignet. - Die Einheitlichkeit der so gewonnenen Serum-Fraktionen wurde von ihnen sowohl durch die Papierelektrophorese als auch durch die Tiselius-Elektrophorese nachgewiesen.

1. γ -Globulin-Fraktion von Normalseren.

Aus 10 der in der Tabelle A VI angeführten Normalseren wurde auf diesem Wege die γ -Globulin-Fraktion isoliert und dann in dieser der Fucosegehalt bestimmt. Es ergaben sich dabei Werte, die in engen Grenzen schwankten, und zwar von 0,22 - 0,27 % (s. Anhang A IX, 1).

2. Isolierte Paraproteinfraktion von Plasmocytomfällen

Ebenso wurden die Paraproteinfraktionen der vorher (s. Tabelle A VII) angeführten Plasmocytomfälle isoliert und auf ihren Fucosegehalt untersucht. Es ergab sich jedoch in keinem Fall eine kennzeichnende Abweichung aus der Schwankungsbreite der Normalseren (s. Anhang A IX, 2).

3. Isolierte Paraproteinfraktionen von Makroglobulinaemien

Demgegenüber zeigten die mit dem gleichen Verfahren aus den angeführten (s. Anhang A VIII) Makroglobulinämiefällen gewonnenen Fraktionen eine Vermehrung des Fucosegehaltes um das 2 - 3-fache der bei normalem γ -Globulin beobachteten Werte (s. Anhang A IX, 3).

Aus diesem unterschiedlichen Verhalten beider Paraproteine muss man den Schluss ziehen, dass die Vermehrung des Fucosegehaltes im Serum von Plasmocytomfällen auf Kosten der vermehrten Paraproteinfraktion, die aber einen gleichen Fucosegehalt besitzt wie normales γ -Globulin, geschieht. Bei den Makroglobulinämiefällen hingegen liegt ein erhöhter Fucosegehalt der Paraproteinfraktion vor, der eine veränderte Struktur des Moleküls vermuten lässt.

^x Jetzt veröffentl. in der Zschr. "Blut" Bd. V, Heft 2 (59)

Ferner ist es möglich, durch die Untersuchung der isolierten Fraktionen von Paraproteinämiefällen, eine differentialdiagnostische Entscheidung darüber zu treffen, ob es sich um ein Plasmocytom oder eine Makroglobulinämie handelt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Eine von DISCHE (18) angegebene spektrophotometrische Methode der Fucosebestimmung in biologischem Material wurde hinsichtlich ihrer Voraussetzungen und Anwendbarkeit auf menschliches Serum und Serumfraktionen untersucht.

Auf Grund eigener Ergebnisse wurden eine Reihe von Abänderungen vorgenommen, die sich auf die Behandlung der Seren, die Entwicklung der Farblösungen, die Messtechnik und die Auswertung der gemessenen Extinktionen erstrecken.

Dabei wurde in vielen Untersuchungen die gute Reproduzierbarkeit festgestellt. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse wurde durch ständigen Vergleich mit Eichlösungen, durch Blindproben und Doppelbestimmungen belegt. Die geringe Schwankungsbreite der Ergebnisse von Normalseren und normalen Serumfraktionen zeigte die gute Brauchbarkeit der Bestimmungen an.

Es wurden diese in normalen Serum und Serumfraktionen und in solchen von Patienten mit Plasmocytom und Makroglobulinämie durchgeführt. Dabei konnten folgende Befunde erhoben werden:

1. Der Fucosegehalt normaler Seren beträgt bezogen auf Eiweiss: 0,10 - 0,13 % (20 Seren)
2. Der Fucosegehalt von Plasmocytom-Seren liegt deutlich über der Schwankungsbreite der Normalseren. (12 Seren)
3. Der Fucosegehalt von Makroglobulinämie-Seren liegt erheblich über dem der Normalseren. (3 Seren)
4. Der Fucosegehalt isolierter γ -Globulin-Fraktionen aus Normalseren beträgt: 0,22 - 0,27 % (12 Fraktionen)
5. Der Fucosegehalt isolierter Papaprotein-Fraktionen von Plasmocytomen weicht nicht von dem normaler γ -Globulin-Fraktionen ab. (10 Fraktionen)
6. Der Fucosegehalt isolierter Paraprotein-Fraktionen von Makroglobulinämien zeigt eine Erhöhung um das 2 - 3-fache gegenüber normalen γ -Globulin-Fraktionen. (3 Fraktionen)

Somit wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Paraproteinfraktionen von Plasmocytomen und Makroglobulinämien festgestellt, indem gezeigt werden konnte, dass erstere in ihrem Fucosegehalt nicht von normalen γ -Globulin-Fraktionen abweichen, letztere dagegen einen erheblich höheren Fucoseanteil aufweisen.

Schliesslich wurde die Möglichkeit erwiesen, durch diese Untersuchungen zwischen beiden Paraproteinämieformen differentialdiagnostisch eine Entscheidung zu treffen.

A I, 1

Klassifizierung der kohlehydrathaltigen Eiweisskörper nach Karl MEYER (53)

I. MUCOPOLYSACCHARIDE

(Polysaccharide, die ein Hexosamin enthalten und frei oder an ein Protein gebunden vorkommen).

A. Neutrale Mucopolysaccharide

1. N-Acetylglucosamin allein = Chitin

2. N-Acetylglucosamin : Galactose = 1 : 1

Neutrales Polysaccharid von Schweinemagenmucosa

(Die Hauptfraktion ist ein Mucoid s. III im Verhältnis 1 : 3)

Pneumococcus-Polysaccharid vom Typ XIV

3. Glucosamin, Galactose und Rhamnose

Shiga-Kruse spez. Polysaccharid

B. Saure Mucopolysaccharide

1. Einfache Mucopolysaccharide:

N-Acetylglucosamin + Glucuronsäure = Hyaluronsäure

N-Acetylgalactosamin + Glucuronsäure = Chondroitin

2. Zusammengesetzte saure Mucopolysaccharide

a) Sulfomucopolysaccharide

α) Glucosamin-N-sulfat, Flucuronsre. + Sulfat im molaren Verhältnis von 1,5 oder 2 in Heparin

β) N-Acetylglucosamin, Glucuronsre. + Sulfat:

Amyloid, Aortafraktionen, Fraktionen aus Schweinemagen

γ) N-Acetylglucosamin, Galactose + Sulfat im molaren Verhältnis 1 : 1 = Keratosulfat

δ) N-Acetylgalactosamin, Glucuronsre. + Sulfat = Chondroitinsulfat A und C

ϵ) N-Acetylgalactosamin, Uronsäure unbekannter Struktur + Sulfat = Chondroitinsulfat B

A I, 2

b) Phosphomucopolysaccharide

- a) Aminzucker, Galactosephosphat; C-Kohlehydrat von Pneumo- und Streptococcen
- β) N-Acetylglucosamin-alkohol-phosphat Substrat des Lysocym

II. MUCOPROTEINE

(Sie resultieren aus den unter I. B beschriebenen sauren Mucopolysacchariden mit einem Protein durch labile Ionenbindung.)

III. MUCOIDE

(Stabile Komplexe, in welchen die Mucopolysaccharide und die Proteine durch Kovalenzbindung vereinigt sind.)

A. Lösliche neutrale Mucoide

(Der Kohlehydratanteil enthält kein Säureradik.)

1. Acetylglucosamin + Galactose im Verhältnis 1 : 1 = Mucoïd des Froschoviductes; Gonadotropine aus Schwangerenurin; Blutgruppensubstanzen aus Magenschleimhaut, Speicheldrüse, Urin und pseudomucinösen Cysten. (Alle diese Fraktionen enthalten FUCOSE. Der Aminozucker soll eine Mischung aus D-Glucosamin und D-Galactosamin sein.)
2. Acetylglucosamin, Mannose und Galactose = Ovomucoïd
3. Einige der neutralen Serum - Mucoïd-Fraktionen

B. Saure Mucoide

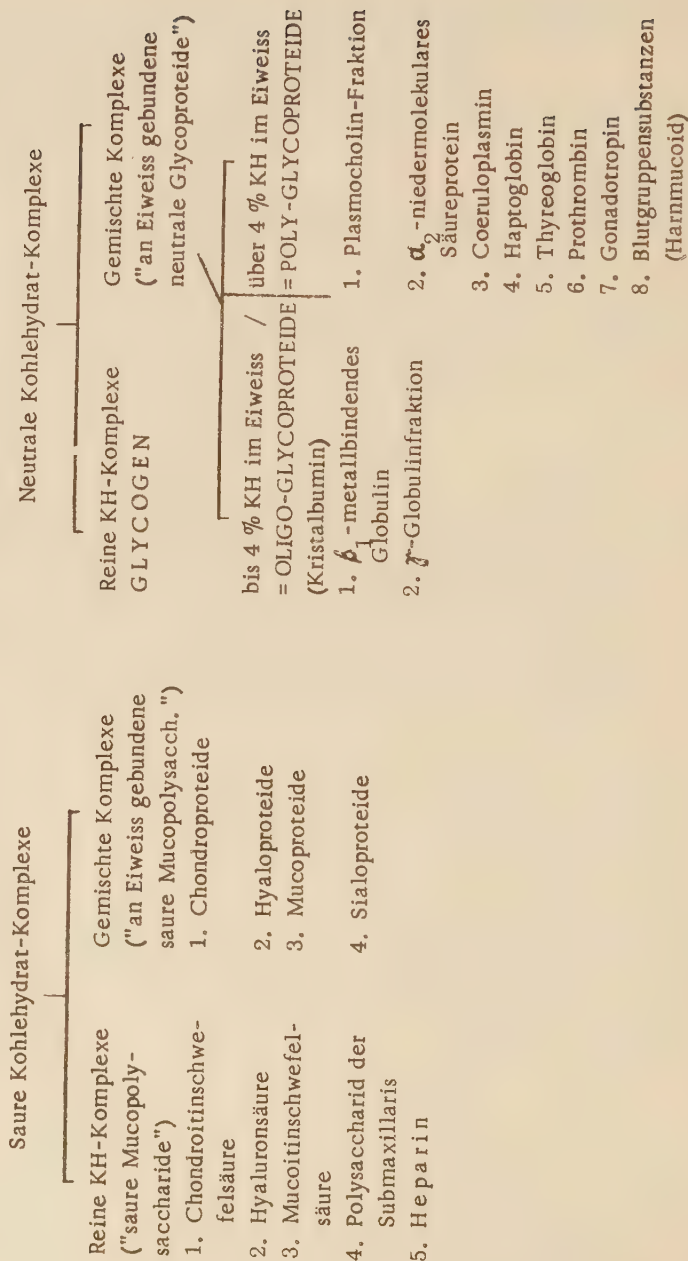
1. Mucine aus der Glandula submaxillaris
2. Seromucoïd
3. Mucoide, die Salinsäure enthalten

IV. GLYCOPROTEIDE

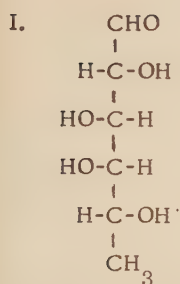
(Sie enthalten unter 4 % Hexosamin, im Gegensatz zu den Mucoïden, die über 4 % Hexosamin haben.)

SERUMGLOBULINFRAKTION

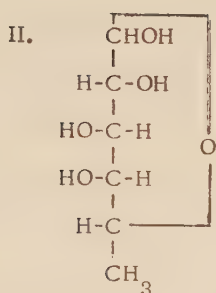
Hochmolekulare, kohlehydrathaltige Körperstoffe mit und ohne Eiweiss nach SÜDHOF (80)



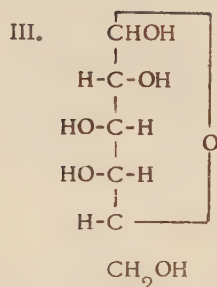
A II, 1



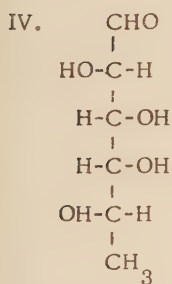
al(dehydo)-D-Fucose



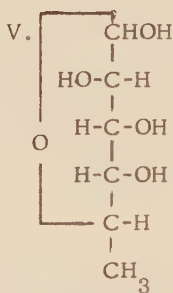
D-Fucopyranose



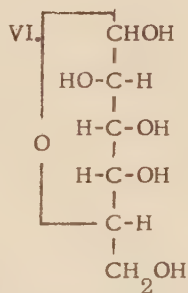
D-Galactopyranose



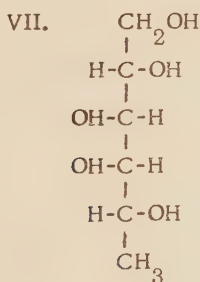
al-L-Fucose



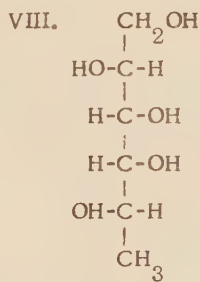
L-Fucopyranose



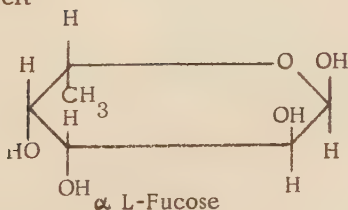
L-Galactopyranose



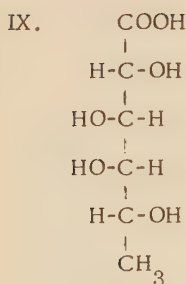
D-Fucit



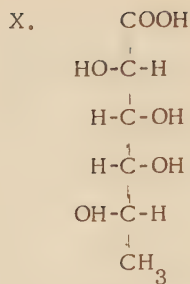
L-Fucit



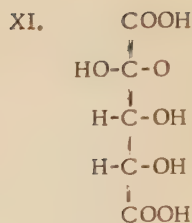
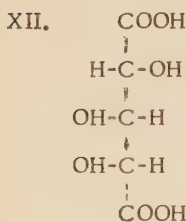
A II, 2



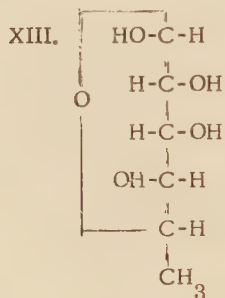
D-Fuconsäure



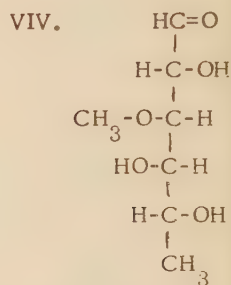
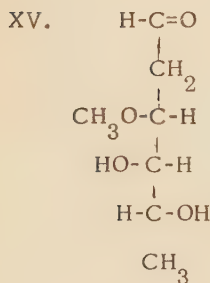
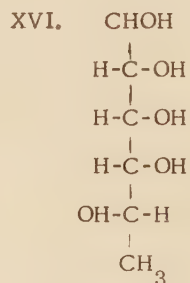
L-Fuconsäure

D-Arabo-Trioxo-
Glutarsäure

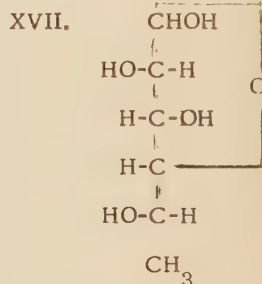
L-Arabo-Trioxo-Glutarsäure



L-Rhamnopyranose

Digitalose
(3 Methyl-D-Fucose)Diginose
(2 Desoxy-3 methyl-D-Fucose) (L-Talomethyllose)

L-Epifucose



L-Fucofuranose

A III. 1

WERTE EINIGER EICHLÖSUNGEN

I. 3 Serien von Fucoselösungen steigender Konzentration (10 - 100 μ) in ihren Extinktionen (gemessen im Beckman-Spektrophotometer Modell DU):

Reihe A:

mμ	•	bl	•	10 μ	•	20 μ	•	30 μ	•	40 μ		
396	•	3	•	212	200	•	408	•	605	590	•	800
430	•	2	•	7	7	•	33	•	43	28	•	54
	•	1	•	199		•	375	•	562		•	746

(Der Wert für "bl" ist die NaOH-H₂SO₄-Extinktion, die gegen einen H₂O-Nullwert bestimmt wurde.)

Reihe B:

m μ	•	bl	•	10 μ	•	20 μ	•	30 μ	•	40 μ
396	•	12	•	202	•	420	•	600	•	785
430	•	7	•	26	•	43	•	52	•	60
	•	5	•	176	•	377	•	548	•	715

Reihe C:

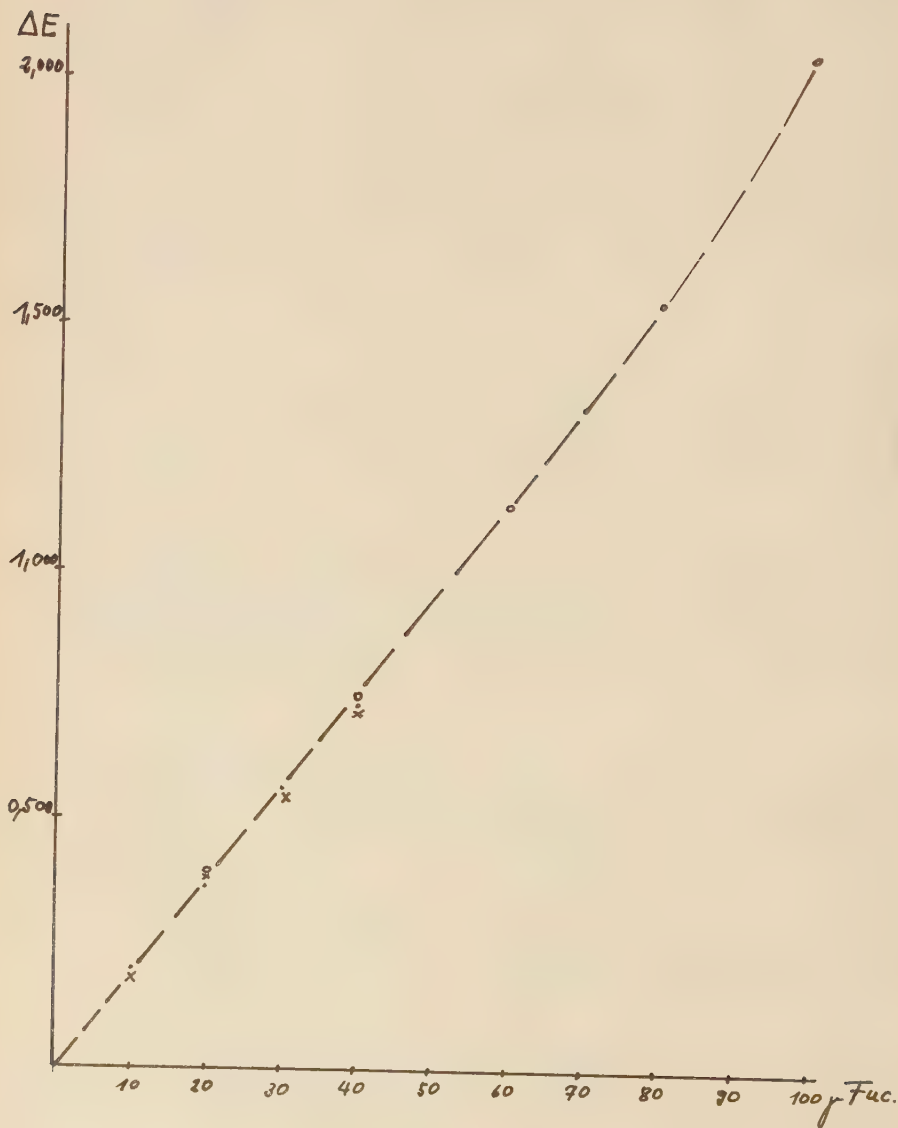
m μ	•	bl	•	20 μ	•	40 μ	•	60 μ	•	80 μ	•	100 μ
396	•	13	•	420/395	•	793/775	•	1180/1213	•	1630/1630	•	2 160/2140
430	•	0	•	23 19	•	38 40	•	64 63	•	87 89	•	108 108
	•	13	•	397 376	•	755 735	•	1116 1150	•	1543 1541	•	2 052 2032
				387		745		1133		1542		2042

II. Eine Serie von Fucoselösungen steigender Konzentration (5 - 30 μ) in ihrer Extinktion (gemessen im Zeiss-Spektralphotometer):

m μ	•	5 μ	•	10 μ	•	20 μ	•	30 μ
396	•	48	•	100	•	205	•	310
430	•	0	•	7	•	19	•	25
	•	48	•	93	•	186	•	285

A III, 2

EXTINKTIONSWERTE VON FUCOSE-EICHLÖSUNGEN I



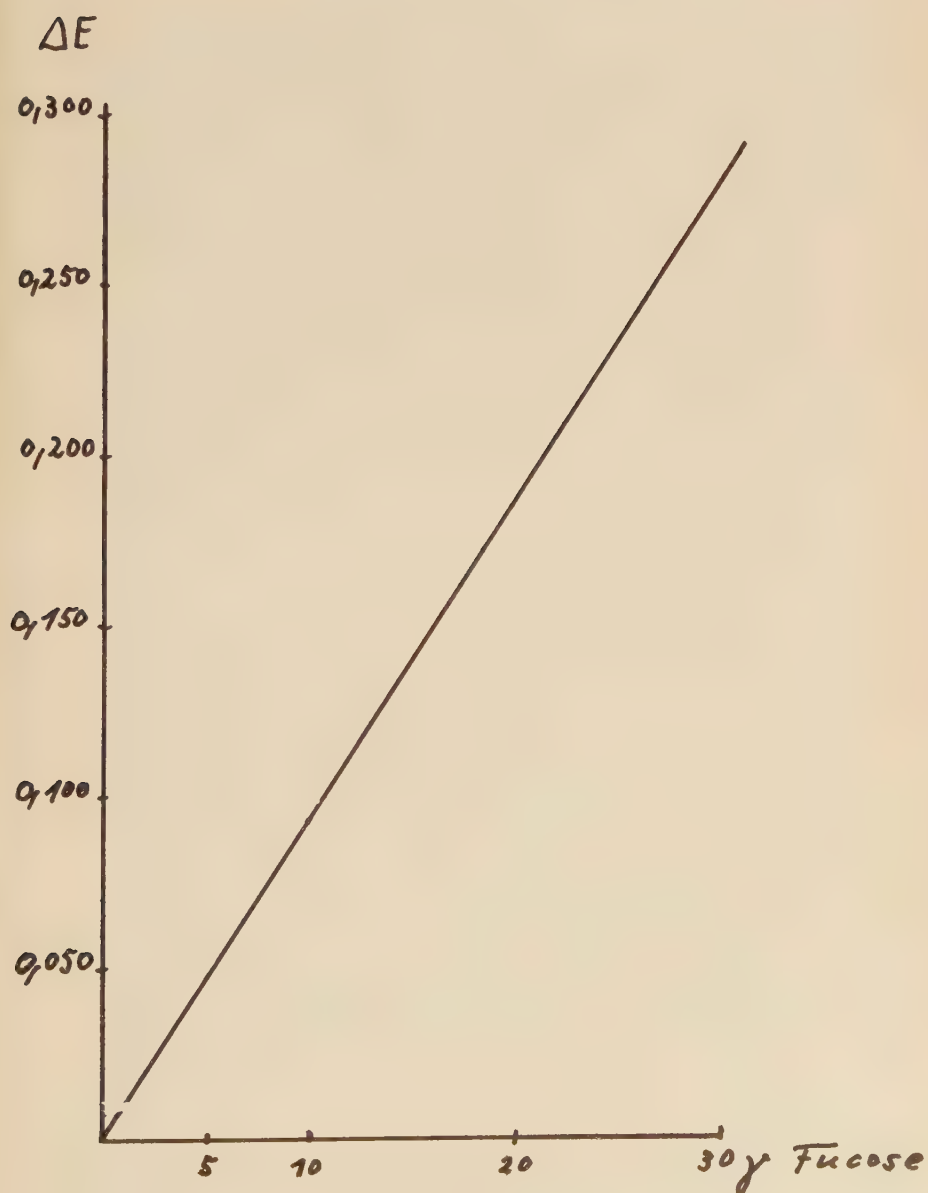
Reihe A = •

Reihe B = x

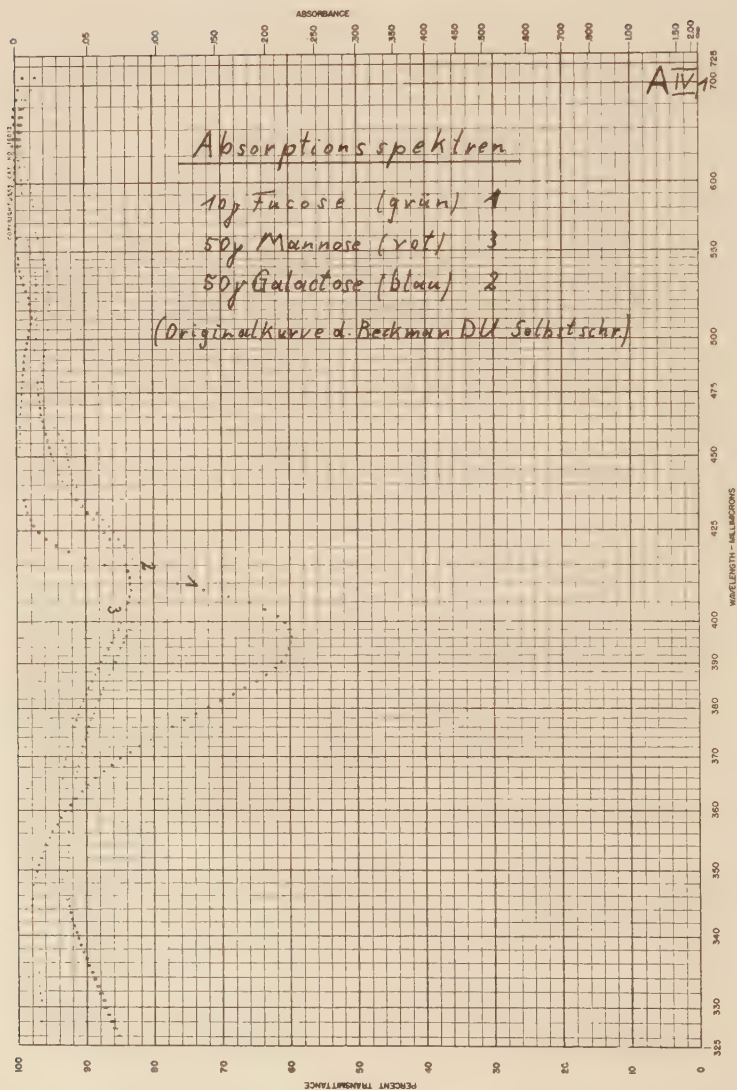
Reihe C = o

A III, 3

FUCOSE-EICHLÖSUNGEN II



ABSORPTIONSSPEKTREN



10% Fucose = 1

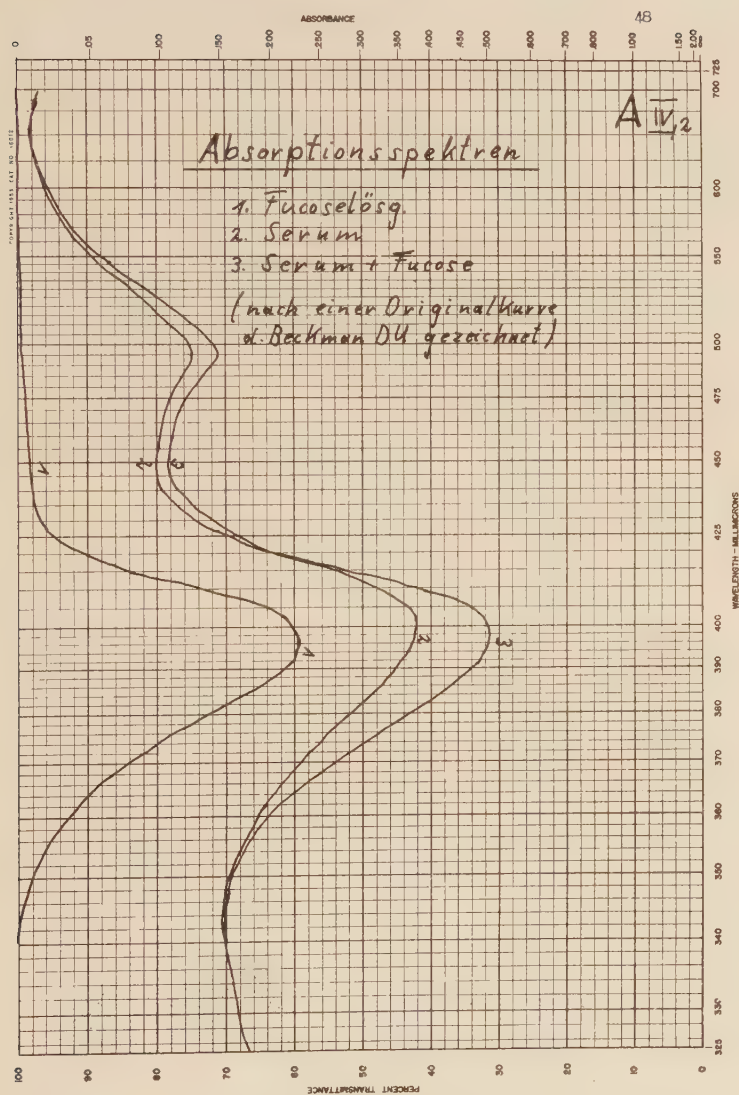
50% Mannose = 3

50% Galactose = 2

(Originalkurve d. Beckmann DU Selbstschr.)

A IV, 2

ABSORPTIONSSPEKTREN



1. Fucoselösung

2. Serum

3. Serum + Fucose

(nach einer Originalkurve d. Beckmann DU gezeichnet)

A V, 1

24-STUNDEN-MESSUNG

von: 1. Serum + Cystein; 2. Serum + Fucose (10 γ) + Cystein;
3. Fucoselösung + Cystein; 4. Serum ohne Cystein.

nach 1 Stunde:

m μ	1.S.+C.	2.S.+F.	3.F.	4.S.o.C.
396	188 190	255 262	78 70	100 99
430	82 87	85 87	16 8	54 48
	106 103	170 175	62 62	46 45
	104,5	172,5		45,5

red.Ser.-Wert: 59,0 x 2 10 γ Fucose : 68,0

Fucose des Serums: 17,4 mg %

nach 2 Stunden:

(Einteilung des Schemas wie oben)

	186 182	272 278	88 88	97 93
	80 78	82 86	10 9	48 47
	106 104	190 192	78 79	49 46
	105	191	78,5	47,5

red.Ser.-Wert: 57,5 x 2 Fucose : 86

Fucose des Serums: 13,4 mg %

nach 3 Stunden

	186 181	282 289	100 100	102 100
	80 78	82 87	12 10	50 48
	106 103	200 202	88 90	52 52
	104,5	201	89	

red. Ser.-Wert: 52,5 x 2 Fucose : 96,5

Fucose des Serums: 10,9 mg %

nach 4 Stunden:

	185 180	285 290	109 108	102 100
	78 78	83 87	12 10	49 48
	107 102	202 203	97 . 98	53 52
	104,5	202,5	97,5	52,5

red.Ser.-Wert: 52,5 x 2 Fucose : 98

Fucose des Serume: 10,6 mg %

A V, 2

nach 5 Stunden:

mu	'	S.+C.	'	S.+F.	'	F.	'	S.o.C.	
396	'	188 182	'	290 292	'	110 110	'	108 106	
430	'	79 78	'	82 87	'	13 12	'	52 52	
	'	109 104	'	208 205	'	97 98	'	56 54	
		106,5		206,5		97,5		55	

red.Ser.-Wert: 51,5 x 2 10 $\frac{7}{11}$ Fucose;100Fucose ser Serums: 10,3 mg %

nach 6 Stunden:

'	187 182	'	288 292	'	112 112	'	110 110
'	78 78	'	82 86	'	15 12	'	52 53
'	109 104	'	206 206	'	97 100	'	58 57
	106,5				98,5		57,5

red.Ser.-Wert: 49 x 2 Fucose:98,0

Fucose des Serums: 9,9 mg %

nach 7 Stunden:

'	188 183	'	288 290	'	112 112	'	112 112
'	78 78	'	82 85	'	15 13	'	54 57
'	110 105	'	206 205	'	97 99	'	58 55
	107,5		205,5		98		56,5

red.Ser.-Wert: 51,0 x 2 Fucose:98,0

Fucose des Serums: 10,5 mg %

nach 9 Stunden:

'	185 181	'	282 288	'	112 113	'	116 114
'	78 78	'	82 85	'	15 15	'	58 56

red.Ser.-Wert: 48 x 2 Fucose:96,5

Fucose ses Serums 10 mg %

nach 10 Stunden:

'	188 181	'	282 285	'	118 119	'	120 120
'	78 77	'	83 85	'	20 18	'	60 60
'	110 104	'	199 200	'	98 101	'	60 60
	107		199,5		99,5		

red.Ser.-Wert: 47 x 2 Fucose 92,5

Fucose des Serums: 10,2 mg %

A V, 3

nach 22 Stunden, 30 Min.:

mμ	°	S.+C.		°	S.+F.		°	F.		°	S.o.C.	
396	°	178	178	°	277	278	°	111	111	°	120	120
430	°	70	72	°	77	80	°	16	13	°	58	58
	°	108	106	°	200	198	°	95	98	°	62	62
		107			199			96.5				

red. Ser. - Wert: 45 x 2

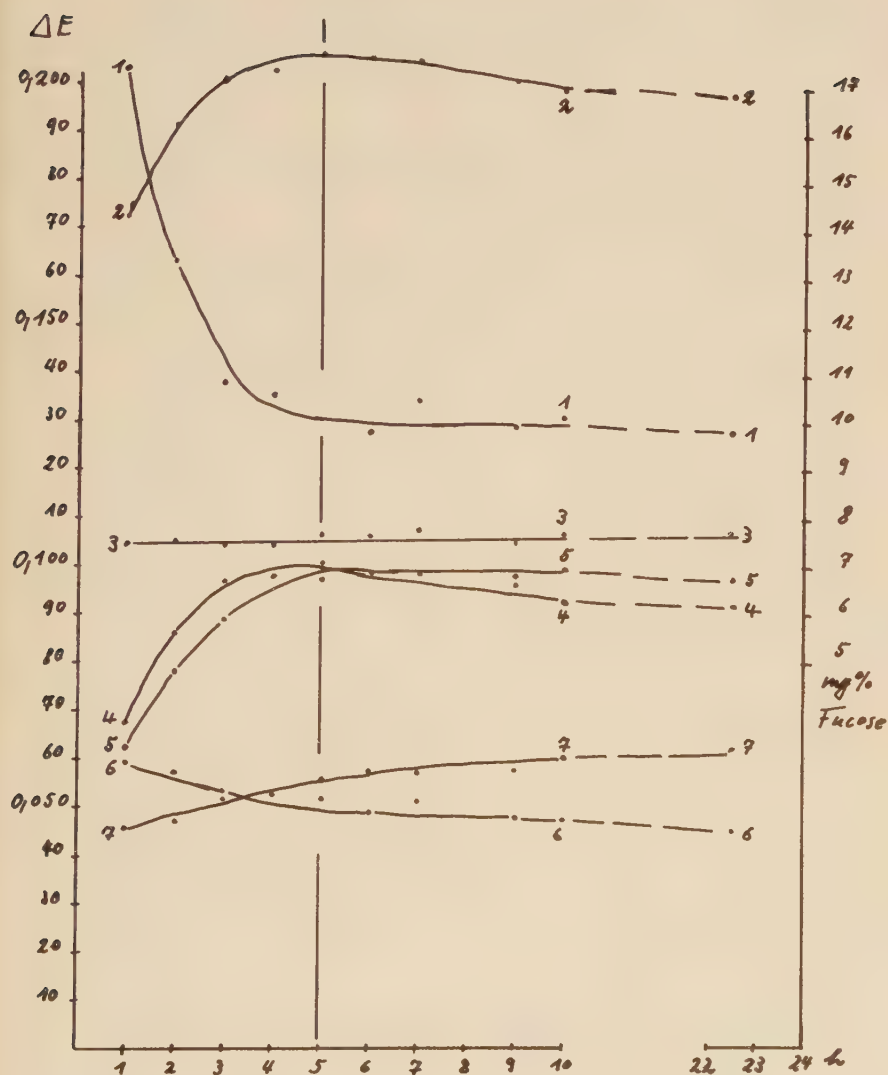
10 γ Fucose: 92

Fucose des Serums: 9,8 mg %

Man kann also sehen, dass der Wert des Fucosegehaltes im Serum von 3 bis 23 Stunden nach Zugabe von Cystein zum Reaktionsgemisch praktisch gleich bleibt.

A V, 4

24-STUNDEN-MESSUNG



1 = berechneter Fucosegehalt

2 = Serum + Fucose + Cystein

3 = Serum + Cystein

4 = Internal Standard (aus [Serum + Fucose] - [Serum ohne Fucose])

5 = Fucosestammlösung

6 = reduzierter Serumwert

7 = Serum ohne Cystein

NORMALE SEREN

Name	Vorname	Alter	BSG	Gesamt- Eiweiss ^x	Alb.	Elektrophor. rel. $\eta^{\rho x}$		γ	Fucose mg %	Fucose % bezo- gen auf Eiweiss
					α_1	α_2	β			
1. Eck.	Rolf	24	7/11	6,82	57,6	3,6	7,0	12,8	19,0	0,11
2. Wern.	Vitus	51	3/8	7,12	58,5	3,8	7,3	12,3	18,1	0,11
3. Mun.	Irmgard	22	6/12	6,98	56,5	4,5	7,9	13,3	17,8	0,12
4. Wag.	Siegfr.	35	4/9	7,40	60,2	3,5	7,9	11,9	16,4	0,11
5. Bick.	Emil	47	4/11	7,21	57,2	3,4	8,0	12,7	18,7	0,10
6. Breu.	Horst	29	2/5	7,54	55,9	4,1	8,2	13,2	18,6	0,12
7. May.	Wolffg.	27	6/11	7,30	55,0	4,0	7,6	11,9	18,5	0,10
8. Max.	Ilse	23	7/12	7,38	57,3	4,3	7,2	11,7	19,5	0,11
9. Gör.	Werner	25	3/8	7,71	59,0	3,5	7,8	11,8	17,9	0,11
10. Leib.	Berth.	37	5/11	6,89	58,1	3,1	8,1	12,3	18,4	0,11
11. Meu.	Karl	23	4/9	7,32	57,2	4,2	8,5	13,3	16,8	0,10
12. Luc.	Rain.	23	4/13	7,25	56,7	3,3	7,7	12,5	19,8	0,12
13. Kut.	Marian.	27	4/10	6,96	60,6	3,0	7,4	12,7	16,4	0,12
14. Brün.	Else	48	7/11	7,13	55,1	4,1	8,2	13,2	19,4	0,11
15. Ried.	Alfons	50	2/8	7,68	58,3	3,0	7,5	12,0	19,2	0,12
16. Bert.	Emil	24	6/10	6,98	59,1	3,2	8,0	12,4	17,3	0,12
17. Mün.	Charl.	51	7/14	7,14	57,7	3,7	8,4	12,2	18,0	0,13
18. Bie.	Anna	39	7/13	7,45	56,1	4,4	8,3	12,6	18,5	0,11
19. Ple.	Josef	41	4/11	7,62	55,4	4,0	8,0	12,7	19,9	0,12
20. Hal.	Irene	18	2/4	7,16	57,2	3,4	7,9	13,1	18,4	0,12

^x Die Serum-eiweiss - Routineuntersuchungen wurden vom Eiweisslabor der I. Med. Univ. - Klinik durchgeführt.

PLASMOCYTOME (Serum)

Name	Vorname	Alter	Gesamt- Eiweiss	Alb. α_1	Elektrophorese rel. %			Fucosegehalt		
					α_2	β_1	β_2	β	γ_1	γ_2
1. Beh.	Martha	67	12.13	29.0	2.0	4.9	6.1	49.2 ^x	8.8	21.3
2. Dor.	Otto	61	8.86	24.6	3.4	5.0	62.4		4.6	17.3
3. Hey.	Paul	64	11.68	23.4	4.9	8.0	8.4		55.3	20.5
4. Kra.	Therese	54	9.63	28.7	5.7	8.0	11.6		46.0	15.3
5. Mat.	Maria	70	10.50	29.6	4.0	7.1	9.8		49.5	17.0
6. Psch.	Marie	65	8.25	36.8	5.5	7.9	8.7		41.1	18.6
7. Raa.	Daniel	62	7.29	36.8	8.2	32.4	12.3		10.3	10.7
8. See.	Magd.	77	10.31	24.0	4.9	7.3	53.7		10.3	18.9
9. Vor.	Josef	50	10.70	16.0	5.4	6.3	62.0		10.3	21.7
10. Wol.	Paul	70	15.02	21.8	4.2	6.3	7.8		6.3	53.6
11. Brau.	Anna	76	7.25	33.1	7.5	10.6	9.5		39.3	10.6
12. Mün.	Pauline	68	11.39	27.8	5.6	7.4	9.3		4.4	45.5
									18.2	0.15

^x Die pathologischen elektrophoretischen Fraktionen sind jeweils unterstrichen.

MAKROGLOBULINÄEMIE-FÄLLE (Serumuntersuchungen)

Name	Vorname	Alter	Gesamt- Eiweiss	Elektrophorese rel. %				χ	mg %	Fucose % bez. auf Eiweiss
				Alb.	α_1	α_2	β			
1. Hül.	Hermann	59	8.38	38.6	4.5	6.1	6.4	<u>44.4</u>	37.0	0.44
2. Mal.	Hermine	51	11.75	30.0	2.2	5.4	8.4	<u>54.0</u>	43.4	0.37
3. Pal.	Gertrud	52	8.58	32.3	5.1	5.9	7.0	<u>49.7</u>	42.6	0.49

A IX

FUCOSEGEHALT ISOLIERTER PROTEINFRAKTIONEN

1. Isolierte γ -Globulinfraktionen aus Normalseren

Lfd. Nr.		Fucosegehalt in % berechnet auf Eiweiss der Fraktion
1		0,22
2		0,25
3		0,27
4		0,22
5	normales γ -Globulin	0,22
6		0,22
7		0,22
8		0,24
9		0,25
10		0,25
Mittelwert		0,24
Schwankungsbreite		0,22 - 0,27

2. Isolierte Paraproteinfraktionen bei Plasmacytom

	Name	Vorname	Diagnose	
1	Beh.	Martha	γ_1 -Plasmacytom	0,23
2	Brau.	Anna	γ -	0,25
3	Dor.	Otto	β_1 -	0,28
4	Hey.	Paul	γ_2 -	0,26
5	Kra.	Therese	γ -	0,25
6	Mat.	Maria	γ -	0,22
7	Mün.	Pauline	γ_2 -	0,22
8	Psch.	Marie	γ_2 -	0,22
9	Raa.	Daniel	α_2 -	0,24
10	See.	Magd.	β_1 -	0,24
11	Vor.	Josef	β_2 -	0,20
12	Wol.	Paul	γ_2 -	0,24

3. Isolierte Paraproteinfraktionen bei Makroglobulinämie

1	Hül.	Hermann	Makroglobulinämie	0,61
2	Mal.	Hermine	"	0,57
3	Päl.	Gertrud	"	0,82

LITERATUR

1. Aminoff, D.; W. T. J. Morgan; M. W. Watkins und R. A. Kekwick:
Biochemic. J. 46; 426 (1947)
2. Anderson, A. J. und N. F. Maglagan:
Biochem. J. 59; 638 (1955)
3. Bendich; E. A. Kabat und A. E. Bezer:
J. Am. Chem. Soc. 69; 2163 (1947)
4. Bial, M.:
Deu. med. Woschr. 29; 477 (1903)
5. Bieler, K. und B. Tollens: Ann. d. Chem. 258; 110, 127 (1890)
6. Blix, G.:
Angew. Chem. 62; 6, 171 (1950)
7. Blix, G.:
in Flaschenträger "Physiolog. Chemie" Bd. I (1951)
8. Boyce, W.; F. K. Garvey und Ch. M. Norfleet jr.:
Am. J. Med. 19; 87 (1955)
9. Bray, H. G.; H. Henry und M. Stacey:
Biochem. J. 40; 124 (1946)
10. Burnet, F. B.; J. F. McCrea und S. G. Anderson:
Nature (Lond.) 160; 404 (1947)
11. Cashmore, A. E.:
Chem. Soc. (Lond.) 718; (1927)
12. Davies, D. A. J.:
Biochem. J. 59; 4-696/704 (1955)
13. Dische, Z.; R. M. Dische; M. Osnos und A. Gellhorn:
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2; No. 1, 21-3 (1955)
14. Dische, Z.; A. Danilczenko und G. Zehmanis:
Chem. a. Biol. of Mucopolys.; Ciba Sympos. (1958)
15. Dische, Z. und M. Osnos:
Fed. Proc. 9; No. 1 (März 1950)
16. Dische, Z. und M. Osnos:
Fed. Proc. 11; No. 1 (März 1952)
17. Dische, Z. und L. B. Shettles:
J. Biol. Chem. 175; 595 (1948)
18. Dische, Z.:
in D. Glick "Methods of Biochem. Analysis" Vol. II,
New York (1955)

19. Dische, Z.: J. Biol. Chem. 167; 189 (1947)
20. Dische Z. und L. B. Shettles:
J. Biol. Chem. 192; 579 (1951)
21. Dohlmann, C. H. und E. A. Balazs:
Arch. Biochem. 57; 445 (1955)
22. Flaschenträger-Lehnartz:
Handb. phys. Chem. (1951)
23. Folks, B. F.; R. A. Grant und J. K. N. Jones:
J. Chem. Soc. (Lond.) 2136 - 40 (1950)
23. Glass, G. B. J.: Lancet CCLXVI 1082 (1954)
25. Glegg, R. E.; D. Eidinger und C. P. Leblond:
Science 120; 895 (1954)
26. Gottschalk, A.: Chem. a. Biol. of Mucopol.; Ciba Symps. (1958)
27. Gottschalk, A.: Nature (London) 170; 662 (1952)
28. Günther, A. und B. Tollens:
Annalen 271; 86, 91 (1890)
29. Günther, A. und B. Tollens:
Ber. d. Deutsch. Chem. Gesell. 23; 1753, 2585 (1890)
30. György, P.; R. Kuhn; C. S. Rose und F. Zilliken:
Am. J. Dis. Child. 84; 482 (1952); 85; 632 (1953)
31. György, P.; C. E. Rose und G. F. Springer:
J. Labor. a. Clin. Med. 43; 543 (1954)
32. György, P.: Chem. a. Biol. of Mucopol. Ciba Sympos. (58)
33. Hamerman, D. und F. T. Hatch:
Proc. of the Soc. for Exp. Biol. a. Med. V 89; 279 (1955)
34. Hamerman, D.; F. T. Hatch; A. Reife und K. W. Bartz:
J. Laborat. Clin. Invest. 46; 848 (1955)
35. Hess, E. L.; W. Ayala und A. Herranen:
J. Am. Chem. Soc. 74; 5410 (1952)
36. Hoppe-Seyler-Thierfelder:
Handb. d. phys. u. path. chem. Analyse

37. Hewitt, L.F.: Biochem. J. 33; 1946 (1938)
Biochem. J. 31; 360, 10, 47, 1534 (1937)
38. Heyns, K.; W. Walter und W. Heyde:
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 304; 279
(1956)
39. Iddles, H. H. und K. S. French.
Industr. enging. chem. analyt. Ed. 8; 283
40. Isliker, H.: Helvet. med. acta 25; 1, 41-53 (1958)
41. Jorpes, E. und Ikuo Yamashina:
7. Coll. d. Gesell. f. phys. Chem. 1956 (Mosbach/Baden)
42. Kabat, E. A.: Bacter. Rev. 13; 189 (1949)
43. Kabat, E. A.; A. Baer; A. E. Bezer und V. Knaub:
J. of exper. Med. 87; 295 (1948)
44. Kabat, E. A.: Chem. a. Biol. of Mucopol. Ciba Sympos. (1958)
45. Klein, G.: Handb. d. Pflanzenanalyse; J. Springer, Wien (1932)
46. Kortüm, G.: Kolorimetrie, Photometrie und Spektrophotometrie;
Springer-Verlag (1955)
47. Krüger, M. und B. Tollens:
Angew. Chem. 1896 (40)
48. Kuhn, R.; A. Gauhe und H. H. Baer:
Ber. deutsch. chem. Gesell. 87; 289 (1954); 86; 827
(1953); 88; 1135 (1955)

Kuhn, R.: Angew. Chem. 67; 184 (1955)
49. Kuhn, Richard und Hussein Ghaleb Osman:
Hoppe-Sexler's Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 303;
108 (1956)
50. Latner, A. L.; R. J. Merrills und L. Raine:
Biochem. J. 63; Nr. 3 501-507 (1956)
51. Latner, A. L.; R. J. Merrills und L. Raine:
Biochem. J. 57; XIX (1954)
52. Laurell, G. B.; H. Laurell und J. Waldenstroem:
Am. J. Med. 12; 27 (1957) Januar

53. Macy, Josion jr. (Meyer, K.):
Found. New York (1955)
54. Mandel, B. und E. Racker:
J. Exper. Med. 98; 417 (1953)
55. McCrea, J. F.:
Biochem. J. 55; 132 (1953)
56. McCrea, J. F.:
Yale J. Biol. a. Med. 26; 191 (1953)
57. McNaught, M. L.; J. A. B. Smith und W. A. P. Block:
J. Sci. Food Agric. 5; 350 (1954)
58. Micheel, F. und F. Suthaus:
Die Naturwissensch. 45; 8, 188 (1958)
59. Molisch, H.:
Ber. 19; 746 (1886)
60. Morgan, W. T. J.:
Chem. a. Biol. of Mucopol. Ciba Sympos.
61. Mütter, A. und B. Tollens:
Ber. 37; 301, 306, 310/(1958), (1904)
62. Newth, F. H.:
Advanc. in Carbohydr. Chem. 6; 83-106 (1951)
63. Odin, L.:
Nature (Lond.) 170; 663 (1952)
64. Odin, L.:
Chem. a. Biol. of Mucopol. Ciba Sympos. (1958)
65. Peach, K. und M. V. Tracey:
Moderne Method. d. Pflanzenanalys.
66. Plötz und Freudenberg: in Flaschenträger "Physiolog. Chem." Bd. 1; 5355
(1951)
67. Rimington, C.:
Biochem. J. 23; 430 (1929); 25; 1062 (1931)
34; 931 (1940); 34; 941 (1940)
68. Ross, A. G.:
J. Sci. Food Agric. 4; 333 (1953)
69. Sannie, C.:
Bull. Soc. Chem. Biol. 33; 1341 (1951)
70. Schultze, H. E.:
Dtsch. med. Wschr. 83; 39 S. 1742 (1958)
71. Schultze, H. E.; R. Schmidtberger und H. Haupt:
Biochem. Z. 329; 496 (1958)
72. Schultze, H. E.:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10; Suppl. 1 (1957)
73. Shettles, L. B.; Z. Dische und M. Osnos:
J. Biol. Chem. 192; 589 (1951)

74. Sonnet, J. : Les Glycoprotéines sériques a l'état normal et pathologique; Ed. Arsčia; Bruxelles (1956)
75. Springer, G.F. : Schweiz. med. Woschr. 87; 434 (1957)
76. Springer, G.F. : Chem. a. Biol. of Mucopol. Ciba Sympos. (1958)
77. Springer, G.F. : 5. Kongr. d. Europ. Gesell. f. Hämatol. (1957)
5. Colloquium
78. Springer, G.F. : Klin. Woschr. 33; 347 (1955)
79. Springer, G.F. und P. György:
Fed. Proc. 12; Nr. 901 (1953)
80. Südhof, H. und H. Kellner:
Die Physiol. u. klin. Bedeutung kohlehydrathaltiger
Körperstoffe; Verlag S. Karger, Basel (1957)
81. Stacey, M; R. E. Deriaz; E. G. Cecce und L. F. Wiggins:
Nature 157; 740 (1946)
82. Stacey, M. : Chem. a. Biol. of Mucopol. Ciba Sympos. (58)
83. Tamm, J. und F. L. Horsfall;
J. Exper. Med. 95; 71 (1953)
84. Tayeau, F. und R. Nivet:
Journ. de Med. 134; Nr. 6 (1957)
85. Tayeau, F. : Journ. de Medic. 131; Nr. 10 (1954)
86. Tollens, B. und F. Rorive:
Ber. 42; 2009 (1909)
87. Tollens, B. und H. Elsner:
Kurzes Handb. d. Kohlehydratc; Verlag. Barth/4. Aufl.
(1935) Leipzig
88. Udransky: Hoppe-Seyler Zeitschr. 12; 355 (1888)
89. Vasseur, E. : Acta Chem. Scand. 6; 376 (1952)
90. Votoček, E. : Zuckerind. Böhm. 24; 248 (1900)
91. Votoček, E. : Zuckerind. Böhm. 15; (1902)
92. Votoček, E. : Ber. Deutsch. Chem. Gesell. 43; 469 (1910)
93. Votoček, E. : Ber. Deutsch. Chem. Gesell. 37; 3861 (1904)

94. Waldron, B. M.: Nature 170; 461 (1952)
95. Waldron, B. M.: Nature 170; 461 (1948)
96. Watkins, M. W. und W. T. J. Morgan:
zit. nach Springer s. 78
97. Weiner, H. E.; J. Mehl und R. J. Winzler:
J. Biol. Chem. 185; 561 (1950);
Fed. Proc. 9; 244 (1950)
98. Westphal, O.; O. Lüderitz; E. Eichenberger und E. Neter:
Chem. a. Biol. of Mucopol. Ciba Sympos. (58)
99. Widtsoe, J. A. und B. Tollens:
Ber. 33; 132 (1900)
Ber. 33; 146 (1900)
Ber. 37; 301 (1904)
100. Windaus, A.: Hoppe-Seyler's Zeitschr. 100; 167 (1917)
101. Winzler, R. J.: in D. Glick "Methods of Biochem. Analys." Vol. II;
New York 1955
102. Winzler, R. J.; A. W. Devon; J. W. Mehl und J. M. Smythe:
J. Clin. Invest. 27; 609/617 (1948)
103. Winzler, R. J.: Chem. a. Biol. of Mucopol. Ciba Sympos. (58)
104. Zanetti, C. U.: Iber. Fortschr. Tierchem. 27; 31 (1897)
Gazz. chim. Ital. I, 160 (1903)

Für die Überlassung des Themas wie für das Zurverfügungstellen von Messapparaten und Laboratoriumseinrichtung danke ich Herrn Professor SCHWIEGK und Herrn Dr. Maximilian KNEDEL sehr, ferner der med. techn. Ass. Frau A. KÖHLER die Unterweisung in der Laboratoriumstechnik.

LEBENS LAUF

Am 8.12.1933 wurde ich, Peter Brünger, als Sohn des Lehrers Heinrich Brünger und seiner Ehefrau Lilli, geborene Krietenstein, in Lage (Lippe) geboren.

Ostern 1940 kam ich in die Volksschule in Lage. Nach vier Jahren, im Herbst 1944, wechselte ich in das Leopoldinum (altsprachliche Gymnasium) zu Detmold über. Neun Jahre später machte ich dort Ostern 1954 das Abitur.

Mein vorklinisches Studium begann ich an der Universität Münster im Sommersemester 1954. Im zweiten bis vierten vorklinischen Semester studierte ich an der Universität Göttingen. Dort bestand ich auch am 30.7.1956 das Physikum.

Die sechs klinischen Semester belegte ich an der Universität München. Zwischen- durch famulierte ich zweimal in der I. Medizinischen Universitätsklinik München, ferner im Städtischen Krankenhaus Lage und im Kreiskrankenhaus Arnstadt (Thür.). Mein Staatsexamen machte ich am 8.12.1959 an der Universität München.

Ich bin seit August 1958 verheiratet und habe eine Tochter.

Bis August 1960 war ich 7 Monate als Medizinal-Ass. an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Göppingen (Württ.) unter Leitung von Prof.Dr.med. Fuchs tätig. Seither bin ich auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Schorndorf (Württ.) unter Chefarzt Dr.med. Fink.



